

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 7 月 29 日 (29.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/063221 A1(51) 国際特許分類⁷: C07K 14/47, A61K 38/00, A61P 1/18,
3/04, 3/06, 3/10, 7/02, 9/10, 13/00, 15/00, 15/06, 15/08,
25/28, 35/00, 35/04, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016978

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 26 日 (26.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-377179
2002 年 12 月 26 日 (26.12.2002) JP(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 北田 千恵
子 (KITADA, Chieko) [JP/JP]; 〒590-0073 大阪府
堺市 南向陽町 1 丁 2-8 Osaka (JP). 浅見 泰司
(ASAMI, Taiji) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県 つくば
市 千現 2 丁目 12-14 Ibaraki (JP). 西澤 直城
(NISHIZAWA, Naoki) [JP/JP]; 〒661-0981 兵庫県 尼
崎市 猪名寺 1 丁目 18-23 Hyogo (JP). 大瀧 徹
也 (OHTAKI, Tetsuya) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城県 つ
くば市 吾妻 3 丁目 14-32 Ibaraki (JP). 樽井 直
樹 (TARUI, Naoki) [JP/JP]; 〒631-0061 奈良県 奈良
市 三碓 1 丁目 6-1 Nara (JP). 松本 寛和 (MAT-
SUMOTO, Hirokazu) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日 2 丁目 35-10 Ibaraki (JP). 野口 次郎
(NOGUCHI, Jiro) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県 つくば
市 二の宮 1 丁目 10-19-1-205 Ibaraki (JP). 松
井 久典 (MATSUI, Hisanori) [JP/JP]; 〒300-1237 茨城
県 牛久市 田宮 2 丁目 37-7-B-201 Ibaraki (JP).(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒
104-0028 東京都 中央区 八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡
ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

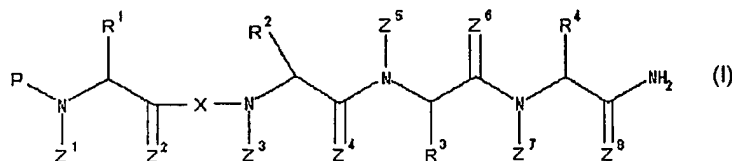
添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METASTIN DERIVATIVE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: メタスチン誘導体およびその用途



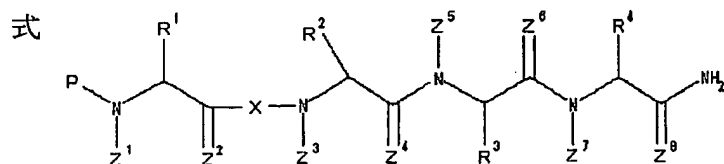
alkyl; each of Z², Z⁴, Z⁶ and Z⁸ is H, O or S; R¹ is H, carbamoyl, etc.; R² is H, cyclic C₁-C₁₀ alkyl, etc.; R³ is C₁-C₈ alkyl having a basic group, etc.; R⁴ is C₆-C₁₂ aromatic hydrocarbon ring group, etc.; X is -NHCH(Q1)YQ2C(=Z9)- (wherein Q1 is C₆-C₁₂ aromatic hydrocarbon ring group, etc.; Q2 is CH₂, etc.; Y is CONH, etc.; and Z9 is H, etc.); and P is arbitrary amino acid residues discontinuously bonded or continuous from the C-terminal side of 1st-48th amino acid sequence segment of specified amino acid sequence, etc.

(57) Abstract: A metastasin derivative or salt thereof excelling in stability in blood and exhibiting cancerous metastasis inhibitory action or cancerous hyperplasia inhibitory action. The metastasin derivative is represented by the formula: (I) wherein each of Z¹, Z³, Z⁵ and Z⁷ is H or C₁-C₃



(57) 要約:

本発明は、血中安定性に優れ、癌転移抑制作用又は癌増殖抑制作用を有する下記式で表されるメタスチン誘導体（I）又はその塩を提供する。



[式中、Z₁、Z₃、Z₅及びZ₇はH又はC₁₋₃アルキル基を、Z₂、Z₄、Z₆及びZ₈はH、O又はSを、R₁はH、カルバモイル基等を、R₂はH、環状のC₁₋₁₀アルキル基等を、R₃は塩基性基を有するC₁₋₈アルキル基等を、R₄はC₆₋₁₂芳香族炭化水素環基等を、Xは-NHCH(Q₁)YQ₂C(=Z₉)-（式中、Q₁はC₆₋₁₂芳香族炭化水素環基等、Q₂はCH₂基等、YはCONH等、Z₉はH等）を、Pは特定のアミノ酸配列の第1-48番目のアミノ酸配列のC末端側から任意の連続した又は不連続に結合したアミノ酸残基等を表す。]

明細書

メタスチン誘導体およびその用途

技術分野

- 5 本発明は、メタスチン誘導体およびその用途に関する。

背景技術

ヒト由来メタスチン（K i S S - 1 ペプチドとも呼ばれる）（W O 0
0 / 2 4 8 9 0 号）およびマウス・ラット由来メタスチン（W O 0 1 /
10 7 5 1 0 4 号 2）が知られている。メタスチンを含有する徐放製剤も知られている（W O 0 2 / 8 5 3 9 9 号）。

メタスチンは、癌転移抑制活性を有しており、癌（例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膵癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巢癌、子宮頸癌、乳癌、腎癌、膀胱癌、脳腫瘍等）の予防・治療に有効であること、
15 膵臓機能調節作用を有しており、膵臓疾患（例えば、急性または慢性膵炎、膵癌等）の予防・治療にも有効であること、胎盤機能調節作用を有しており、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩異常の予防・治療に有効であることが報告されている（W O 0 0 / 2 4 8 9 0 号；W O 0 1 / 7 5 1 0 4 号 2
20 ; W O 0 2 / 8 5 3 9 9 号）。

発明の開示

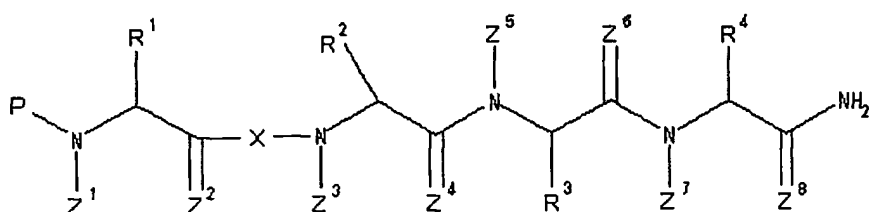
本発明は、優れた癌転移抑制活性、癌増殖抑制活性等を有する安定なメタスチン誘導体を提供することを目的とする。

- 25 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、メタスチンの構成アミノ酸を特定の修飾基で修飾することにより、予想外にも天然型メタスチンよりも血中安定性などが向上し、かつ優れた癌転移抑制活性や癌増殖抑制活性を示すことを見出した。さらに、本発明者らは、メタスチンおよびメタスチン誘導体が、予想外にも従来知られて

いた作用とは全く異なる血糖上昇作用、膵グルカゴン分泌促進作用、尿生成促進作用を有することを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

5 〔１〕式



〔式中、 Z^1 、 Z^3 、 Z^5 および Z^7 はそれぞれ水素原子または C_{1-3} アルキル基を、 Z^2 、 Z^4 、 Z^6 および Z^8 はそれぞれ水素原子、OまたはSを、

R^1 は（１）水素原子または（２）置換されていてもよいカルパモイル基、置換されていてもよいヒドロキシル基および置換されていてもよい芳香族環基から成る群から選ばれる基で置換されていてもよい C_{1-8} アルキル基を、

R^2 は（１）水素原子または（２）環状または鎖状の C_{1-10} アルキル基または（３）環状アルキル基と鎖状アルキル基からなる C_{1-10} アルキル基を、

R^3 は（１）置換されていてもよい塩基性基を有し、さらに他の置換基を有していてもよい C_{1-8} アルキル基、

（２）置換されていてもよい塩基性基を有し、さらに他の置換基を有していてもよいアラルキル基、

（３）置換されていてもよい塩基性基を有している炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基を有し、さらに他の置換基を有していてもよい C_{1-4} アルキル基、または

（４）置換されていてもよい塩基性基を有している炭素数7以下の非芳

香性複素環基を有し、さらに他の置換基を有していてもよい C_{1-4} アルキル基を、

R^4 は(1)置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基、

(2)置換されていてもよい、1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、
5 酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる
5ないし14員芳香族複素環基、

(3)置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基、

(4)置換されていてもよい、3ないし11個の炭素原子と、窒素原子、
、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからな
10 る5ないし14員芳香族縮合複素環基、

(5)置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基、
および

(6)置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基、
から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル
15 基を、

Xは式 $-NHCH(Q^1)YQ^2C(=Z^9)-$

(式中、 Q^1 は(1)置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基、
、

(2)置換されていてもよい、1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、
20 酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる
5ないし14員芳香族複素環基、

(3)置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基、

(4)置換されていてもよい、3ないし11個の炭素原子と、窒素原子、
、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからな
25 る5ないし14員芳香族縮合複素環基、

(5)置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基、
および

(6)置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基、
から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル

基を、 Q^2 は(1)カルバモイル基およびヒドロキシル基から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル基で置換されていてもよい CH_2 、(2)カルバモイル基およびヒドロキシル基から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル基で置換されていてもよいNHまたは(3)Oを、

Yは C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい、式 $-CONH-$ 、 $-CSNH-$ 、 $-CH_2NH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-CH_2S-$ または $-CH_2CH_2-$ で表わされる基を、

Z^9 は水素原子、OまたはSを示す)で表わされる基を、

10 Pは(1)水素原子、

(2)配列番号:1で表わされるアミノ酸配列の第1~48番目のアミノ酸配列のC末端側から任意の連続したまたは不連続に結合したアミノ酸残基、

(3)式 $J^1 - J^2 - C(J^3)(Q^3)Y^1C(J^4)(Q^4)Y^2C(J^5)(Q^5)Y^3C(J^6)(Q^6)C(=Z^{10}) -$

(式中、 J^1 は(a)水素原子または(b)置換基を有していてもよい環基を含む置換基で置換されていてもよい、(i) C_{1-15} アシル基、(ii) C_{1-15} アルキル基、(iii) C_{6-14} アリール基、(iv)カルバモイル基、(v)カルボキシル基、(vi)スルフィノ基、(vii)アミジノ基、または(viii)グリオキシロイル基を、

20 J^2 は(1) C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよいNH、(2) C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい CH_2 、(3)Oまたは(4)Sを、

$J^3 \sim J^6$ はそれぞれ水素原子または C_{1-3} アルキル基を、

25 $Q^3 \sim Q^6$ はそれぞれ、

(1)置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基、

(2)置換されていてもよい、1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族複素環基、

- (3) 置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基、
- (4) 置換されていてもよい、3ないし11個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族縮合複素環基、
- 5 (5) 置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基、
- (6) 置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基、
- (7) 置換されていてもよいアミノ基、
- (8) 置換されていてもよいグアニジノ基、
- 10 (9) 置換されていてもよいヒドロキシル基、
- (10) 置換されていてもよいカルボキシル基、
- (11) 置換されていてもよいカルバモイル基、および
- (12) 置換されていてもよいスルフヒドリル基
- から成る群から選ばれる置換基を有していてもよい C_{1-4} アルキル基又は水素原子を示し、
- 15 J^3 と Q^3 、 J^4 と Q^4 、 J^5 と Q^5 、 J^6 と Q^6 が結合することで、あるいは J^2 と Q^3 、 Y^1 と Q^4 、 Y^2 と Q^5 、 Y^3 と Q^6 が結合することで環を形成してもよい、
- $Y^1 \sim Y^3$ はそれぞれ $-CON(J^{13})-$ 、 $-CSN(J^{13})-$ 、 $-C(J^{14})N(J^{13})-$ または $-N(J^{13})CO-$ (J^{13} および J^{14} はそれぞれ水素原子または C_{1-3} アルキル基を示す) で示される基を示し、
- Z^{10} は水素原子、O または S を示す) で表わされる基、
- (4) 式 $J^1 - J^2 - C(J^7)(Q^7)Y^2C(J^8)(Q^8)Y^3C(J^9)(Q^9)C(=Z^{10})-$
- 25 (式中、 J^1 および J^2 はそれぞれ前記と同意義を、
- $J^7 \sim J^9$ は J^3 と同意義を、
- $Q^7 \sim Q^9$ は Q^3 と同意義を、
- Y^2 および Y^3 は前記と同意義を、
- Z^{10} は前記と同意義を示し、

J^7 と Q^7 、 J^8 と Q^8 、 J^9 と Q^9 が結合することで、あるいは J^2 と Q^7 、 Y^2 と Q^8 、 Y^3 と Q^9 が結合することで環を形成してもよい。)で表わされる基、

(5) 式 $J^1 - J^2 - C(J^{10})(Q^{10})Y^3C(J^{11})(Q^{11})C$
5 $(=Z^{10}) -$

(式中、 J^1 および J^2 は前記と同意義を、

J^{10} および J^{11} は J^3 と同意義を、

Q^{10} および Q^{11} は Q^3 と同意義を、

Y^3 は前記と同意義を、

10 Z^{10} は前記と同意義を示し、

J^{10} と Q^{10} 、 J^{11} と Q^{11} が結合することで、あるいは J^2 と Q^{10} 、 Y^3 と Q^{11} が結合することで環を形成してもよい。)で表わされる基、

(6) 式 $J^1 - J^2 - C(J^{12})(Q^{12})C (=Z^{10}) -$

(式中、 J^1 および J^2 は前記と同意義を、

15 J^{12} は J^3 と同意義を、

Q^{12} は Q^3 と同意義を、

Z^{10} は前記と同意義を示し、

J^{12} と Q^{12} が結合することで、あるいは J^2 と Q^{12} が結合することで環を形成してもよい。)で表わされる基、または

20 (7) 式 $J^1 -$ (J^1 は前記と同意義を示す) で表わされる基を示す。
。] で表わされるメタスチン誘導体 (I) (ただし、配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列の第1～54番目、第2～54番目、第3～54番目、第4～54番目、第5～54番目、第6～54番目、第7～54番目、第8～54番目、第9～54番目、第10～54番目、第11～
25 54番目、第12～54番目、第13～54番目、第14～54番目、第15～54番目、第16～54番目、第17～54番目、第18～54番目、第19～54番目、第20～54番目、第21～54番目、第22～54番目、第23～54番目、第24～54番目、第25～54番目、第26～54番目、第27～54番目、第28～54番目、第2

9～54番目、第30～54番目、第31～54番目、第32～54番目、第33～54番目、第34～54番目、第35～54番目、第36～54番目、第37～54番目、第38～54番目、第39～54番目、第40～54番目、第41～54番目、第42～54番目、第43～54番目、第44～54番目、第45～54番目、第46～54番目、第47～54番目、第48～54番目または第49～54番目のアミノ酸配列からなるペプチドを除く) またはその塩、

- [2] (i) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (化合物番号141)、
- 10 (ii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂ (化合物番号174)、
- (iii) 3-(3-Indolyl)propionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (化合物番号260)、
- (iv) 3-Phenylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (化合物番号269)、
- 15 (v) 2-(indol-3-yl)ethylcarbamoyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (化合物番号279)、
- (vi) D-Tyr-Asn-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (化合物番号286)、
- 20 (vii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe Ψ (CSNH) Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (化合物番号296)、
- (viii) Tyr Ψ (CH₂NH) Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (化合物番号300)、
- (ix) D-Tyr-D-Asn-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (化合物番号303)、
- 25 (x) D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (化合物番号305)、
- (xi) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe(4F)-NH₂ (化合物番号318)、

- (xii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe Ψ (NHCO) Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
(化合物番号319) 、
- (xiii) 3-Pyridylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂ (化合物番号322) 、
- 5 (xiv) 4-Imidazoleacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
(化合物番号323) 、
- (xv) D-Tyr-D-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Trp-NH₂ (化合物番号385) 、または
- (xvi) D-Tyr-D-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Trp-NH₂ (化合物番号386) である請求項1記載のメタスチン誘導体 (I) またはその塩、
- 10 [3] 上記 [1] 記載のメタスチン誘導体 (I) またはその塩のプロドラッグ、 [4] 上記 [1] 記載のメタスチン誘導体 (I) またはその塩あるいはそのプロドラッグを含有してなる医薬、
- 15 [5] 癌転移抑制剤または癌増殖抑制剤である上記 [4] 記載の医薬、
[6] 癌の予防・治療剤である上記 [4] 記載の医薬、
[7] 膵臓機能調節剤である上記 [4] 記載の医薬、
[8] 急性もしくは慢性膵炎または膵癌の予防・治療剤である上記 [4] 記載の医薬、
- 20 [9] 胎盤機能調節剤である上記 [4] 記載の医薬、
[1 0] 絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防・治療剤である上記 [4] 記載の医薬、
[1 1] 性腺機能改善剤である上記 [4] 記載の医薬、
- 25 [1 2] ホルモン依存性癌 (例えば、前立腺癌、乳癌) 、不妊症、子宮内膜症または子宮筋腫の予防・治療剤である上記 [4] 記載の医薬、
[1 3] 排卵誘発または促進剤である上記 [4] 記載の医薬、
[1 4] 性腺刺激ホルモン分泌促進剤または性ホルモン分泌促進剤である上記 [4] 記載の医薬、

〔15〕アルツハイマー病または軽度認知障害の予防・治療剤である上記〔4〕記載の医薬、

〔16〕哺乳動物に対して、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする癌転移抑制または癌増殖抑制方法、

〔17〕哺乳動物に対して、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法、

〔18〕哺乳動物に対して、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする膵臓機能調節方法、

〔19〕哺乳動物に対して、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする急性もしくは慢性膵炎または膵癌の予防・治療方法、

〔20〕哺乳動物に対して、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする胎盤機能調節方法、

〔21〕哺乳動物に対して、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防・治療方法、

〔22〕哺乳動物に対して、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする性腺機能改善方法、

〔23〕哺乳動物に対して、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とするホルモン依存性癌（例えば、前立腺癌、乳癌）、不妊症、子宮内膜症または子宮筋腫の予防・治療方法、

〔24〕哺乳動物に対して、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）

またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする排卵誘発または促進方法、

〔25〕哺乳動物に対して、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする性腺刺激ホルモン分泌促進方法または性ホルモン分泌促進方法、

〔26〕哺乳動物に対して、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病または軽度認知障害の予防・治療方法、

〔27〕癌転移抑制剤または癌増殖抑制剤を製造するための上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用、

〔28〕癌の予防・治療剤を製造するための上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用、

〔29〕膵臓機能調節剤を製造するための上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用、

〔30〕急性もしくは慢性膵炎または膵癌の予防・治療剤を製造するための上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用、

〔31〕胎盤機能調節剤を製造するための上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用、

〔32〕絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防・治療剤を製造するための上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用、

〔33〕性腺機能改善剤を製造するための上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用、

〔34〕ホルモン依存性癌（例えば、前立腺癌、乳癌）、不妊症、子宮内膜症または子宮筋腫の予防・治療剤を製造するための上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグの使

用、

〔 3 5 〕 排卵誘発または促進剤を製造するための上記〔 1 〕記載のメタスチン誘導体（ I ）またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用、

〔 3 6 〕 性腺刺激ホルモン分泌促進剤または性ホルモン分泌促進剤を製造するための上記〔 1 〕記載のメタスチン誘導体（ I ）またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用、

〔 3 7 〕 アルツハイマー病または軽度認知障害の予防・治療剤を製造するための上記〔 1 〕記載のメタスチン誘導体（ I ）またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用、

〔 3 8 〕 メタスチン受容体アゴニストを含有してなる膵グルカゴン分泌促進剤、

〔 3 9 〕 メタスチン受容体アゴニストを含有してなる尿生成促進剤、

〔 4 0 〕 メタスチン受容体アゴニストを含有してなる肥満、高脂血症、2 型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤、

〔 4 1 〕 メタスチン受容体アゴニストが請求項 1 記載のメタスチン誘導体（ I ）またはその塩あるいはそのプロドラッグである上記〔 3 8 〕～

〔 4 0 〕 記載の剤、

〔 4 2 〕 哺乳動物に対して、メタスチン受容体アゴニストの有効量を投与することを特徴とする膵グルカゴン分泌促進方法、

〔 4 3 〕 哺乳動物に対して、メタスチン受容体アゴニストの有効量を投与することを特徴とする尿生成促進方法、

〔 4 4 〕 哺乳動物に対して、メタスチン受容体アゴニストの有効量を投与することを特徴とする肥満、高脂血症、2 型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療方

法、

〔４５〕膵グルカゴン分泌促進剤を製造するためのメタスチン受容体アゴニストの使用、

〔４６〕尿生成促進剤を製造するためのメタスチン受容体アゴニストの
5 使用、および

〔４７〕肥満、高脂血症、２型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤を製造するための
10 のメタスチン受容体アゴニストの使用を提供する。

さらに、本発明は、

〔１〕メタスチンまたはその塩を含有してなる血糖上昇剤、

〔２〕メタスチンまたはその塩を含有してなる膵グルカゴン分泌促進剤、

15 〔３〕メタスチンまたはその塩を含有してなる尿生成促進剤、

〔４〕メタスチンまたはその塩を含有してなる肥満、高脂血症、２型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪
20 毒性の予防・治療剤、

〔５〕メタスチンをコードするDNAを含有するDNAを含有してなる血糖上昇剤、

〔６〕メタスチンをコードするDNAを含有するDNAを含有してなる膵グルカゴン分泌促進剤、

25 〔７〕メタスチンをコードするDNAを含有するDNAを含有してなる尿生成促進剤、

〔８〕メタスチンをコードするDNAを含有するDNAを含有してなる肥満、高脂血症、２型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安

定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤、

〔 9 〕メタスチンをコードするDNAを含有するDNAを含有してなる肥満、高脂血症、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患、脂肪毒性、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、頻尿、夜尿症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の診断剤、

10 〔 1 0 〕メタスチンまたはその塩に対する抗体を含有してなる血糖低下剤、

〔 1 1 〕メタスチンまたはその塩に対する抗体を含有してなる膵グルカゴン分泌抑制剤、

15 〔 1 2 〕メタスチンまたはその塩に対する抗体を含有してなる尿生成抑制剤、

〔 1 3 〕メタスチンまたはその塩に対する抗体を含有してなる糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤、

20 〔 1 4 〕メタスチンまたはその塩に対する抗体を含有してなる肥満、高脂血症、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患、脂肪毒性、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、頻尿、夜尿症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の診断剤、

〔 1 5 〕メタスチンをコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNAを含有してなる血糖低下剤、

〔16〕メタスチンをコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNAを含有してなる膵グルカゴン分泌抑制剤、

〔17〕メタスチンをコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNAを含有してなる尿生成抑制剤、

- 5 〔18〕メタスチンをコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNAを含有してなる糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤、

- 10 〔19〕メタスチンが、

（1）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチド、

- 15 （2）配列番号：3で表わされるアミノ酸配列のN末端から第134～141番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチド、

（3）配列番号：5で表わされるアミノ酸配列のN末端から第138～145番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチド、または

- 20 （4）配列番号：7で表わされるアミノ酸配列のN末端から第112～119番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドである上記〔1〕～〔18〕記載の剤、

〔20〕メタスチン受容体またはその塩を含有してなる血糖上昇剤、

- 25 〔21〕メタスチン受容体またはその塩を含有してなる膵グルカゴン分泌促進剤、

〔22〕メタスチン受容体またはその塩を含有してなる尿生成促進剤、

〔23〕メタスチン受容体またはその塩を含有してなる肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪

萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患
または脂肪毒性の予防・治療剤、

〔24〕メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAを含有
してなる血糖上昇剤、

5 〔25〕メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAを含有
してなる膵グルカゴン分泌促進剤、

〔26〕メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAを含有
してなる尿生成促進剤、

〔27〕メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAを含有
10 してなる肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経
障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗
性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ
、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤、

〔28〕メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAを含有
15 してなる肥満、高脂血症、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病
腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖
尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、
血栓性疾患、脂肪毒性、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシ
ス、頻尿、夜尿症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬
20 化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の診断剤、

〔29〕メタスチン受容体またはその塩に対する抗体を含有してなる血
糖低下剤、

〔30〕メタスチン受容体またはその塩に対する抗体を含有してなる膵
グルカゴン分泌抑制剤、

25 〔31〕メタスチン受容体またはその塩に対する抗体を含有してなる尿
生成抑制剤、

〔32〕メタスチン受容体またはその塩に対する抗体を含有してなる糖
尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿
病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾

患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤、

〔33〕メタスチン受容体またはその塩に対する抗体を含有してなる肥満、高脂血症、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患、脂肪毒性、糖尿病、耐糖能障害、ケトosis、アシドーシス、頻尿、夜尿症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の診断剤、

10 〔34〕メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNAを含有してなる血糖低下剤、

〔35〕メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNAを含有してなる膵グルカゴン分泌抑制剤、

15 〔36〕メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNAを含有してなる尿生成抑制剤、

〔37〕メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNAを含有してなる糖尿病、耐糖能障害、ケトosis、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤、

20 〔38〕メタスチン受容体が配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質である上記〔1〕～〔22〕記載の剤、

〔39〕メタスチンまたはその塩および（または）メタスチン受容体、その部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする血糖調節薬、膵グルカゴン調節薬または尿生成調節薬のスクリーニング方法、

25 〔40〕メタスチンまたはその塩および（または）メタスチン受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする血糖調節薬、膵グルカゴン調節薬または尿生成調節薬のスクリーニング用キット、

- 〔４１〕メタスチンをコードするDNAを含有するDNAおよび（または）メタスチン受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNAを用いることを特徴とする血糖調節薬、膵グルカゴン調節薬または尿生成調節薬のスクリーニング方法、
- 5 〔４２〕メタスチンをコードするDNAを含有するDNAおよび（または）メタスチン受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNAを含有することを特徴とする血糖調節薬、膵グルカゴン調節薬または尿生成調節薬のスクリーニング用キット、
- 10 〔４３〕メタスチン受容体に対するアンタゴニストを含有してなる血糖低下剤、
- 〔４４〕メタスチン受容体に対するアンタゴニストを含有してなる膵グルカゴン分泌抑制剤、
- 〔４５〕メタスチン受容体に対するアンタゴニストを含有してなる尿生成抑制剤、
- 15 〔４６〕メタスチン受容体に対するアンタゴニストを含有してなる糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤、
- 20 〔４７〕メタスチンの発現を促進する物質を含有してなる血糖上昇剤、
- 〔４８〕メタスチンの発現を促進する物質を含有してなる膵グルカゴン分泌促進剤、
- 〔４９〕メタスチンの発現を促進する物質を含有してなる尿生成促進剤、
- 25 〔５０〕メタスチンの発現を促進する物質を含有してなる肥満、高脂血症、２型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤、

〔51〕メタスチンの発現を抑制する物質を含有してなる血糖低下剤、

〔52〕メタスチンの発現を抑制する物質を含有してなる膵グルカゴン分泌抑制剤、

5 〔53〕メタスチンの発現を抑制する物質を含有してなる尿生成抑制剤、

〔54〕メタスチンの発現を抑制する物質を含有してなる糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤、

〔55〕メタスチン受容体の発現を促進する物質を含有してなる血糖上昇剤、

〔56〕メタスチン受容体の発現を促進する物質を含有してなる膵グルカゴン分泌促進剤、

15 〔57〕メタスチン受容体の発現を促進する物質を含有してなる尿生成促進剤、

〔58〕メタスチン受容体の発現を促進する物質を含有してなる肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤、

〔59〕メタスチン受容体の発現を抑制する物質を含有してなる血糖低下剤、

25 〔60〕メタスチン受容体の発現を抑制する物質を含有してなる膵グルカゴン分泌抑制剤、

〔61〕メタスチン受容体の発現を抑制する物質を含有してなる尿生成抑制剤、

〔62〕メタスチン受容体の発現を抑制する物質を含有してなる糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎

症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤、

〔63〕哺乳動物に対して、

- 5 (1) メタスチンまたはその塩、
- (2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNA、
- (3) メタスチン受容体またはその塩、
- (4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNA、
- (5) メタスチンの発現を促進する物質、または
- 10 (6) メタスチン受容体の発現を促進する物質の有効量を投与すること
を特徴とする血糖上昇方法、

〔64〕哺乳動物に対して、

- (1) メタスチンまたはその塩、
- (2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNA、
- 15 (3) メタスチン受容体またはその塩、
- (4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNA、
- (5) メタスチンの発現を促進する物質、または
- (6) メタスチン受容体の発現を促進する物質の有効量を投与すること
を特徴とする膵グルカゴン分泌促進方法、

20 〔65〕哺乳動物に対して、

- (1) メタスチンまたはその塩、
- (2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNA、
- (3) メタスチン受容体またはその塩、
- (4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNA、
- 25 (5) メタスチンの発現を促進する物質、または
- (6) メタスチン受容体の発現を促進する物質の有効量を投与すること
を特徴とする肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病
神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン
抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノ

ーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療方法、

〔66〕哺乳動物に対して、

(1) メタスチンまたはその塩に対する抗体、

(2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNAに対するアンチ

5 センスDNA、

(3) メタスチン受容体またはその塩に対する抗体、

(4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAに対する
アンチセンスDNA、

(5) メタスチン受容体に対するアンタゴニスト、

10 (6) メタスチンの発現を抑制する物質、または

(7) メタスチン受容体の発現を抑制する物質の有効量を投与すること
を特徴とする血糖低下方法、

〔67〕哺乳動物に対して、

(1) メタスチンまたはその塩に対する抗体、

15 (2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNAに対するアンチ
センスDNA、

(3) メタスチン受容体またはその塩に対する抗体、

(4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAに対する
アンチセンスDNA、

20 (5) メタスチン受容体に対するアンタゴニスト、

(6) メタスチンの発現を抑制する物質、または

(7) メタスチン受容体の発現を抑制する物質の有効量を投与すること
を特徴とする膵グルカゴン分泌抑制方法、

〔68〕哺乳動物に対して、

25 (1) メタスチンまたはその塩に対する抗体、

(2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNAに対するアンチ
センスDNA、

(3) メタスチン受容体またはその塩に対する抗体、

(4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAに対する

アンチセンスDNA、

(5) メタスチン受容体に対するアンタゴニスト、

(6) メタスチンの発現を抑制する物質、または

(7) メタスチン受容体の発現を抑制する物質の有効量を投与すること

- 5 を特徴とする糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障の予防・治療方法、

[69] 血糖上昇剤を製造するための

- 10 (1) メタスチンまたはその塩、

(2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNA、

(3) メタスチン受容体またはその塩、

(4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNA、

(5) メタスチンの発現を促進する物質、または

- 15 (6) メタスチン受容体の発現を促進する物質の使用、

[70] 膵グルカゴン分泌促進剤を製造するための

(1) メタスチンまたはその塩、

(2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNA、

(3) メタスチン受容体またはその塩、

- 20 (4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNA、

(5) メタスチンの発現を促進する物質、または

(6) メタスチン受容体の発現を促進する物質の使用、

- [71] 肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤を製造するための

(1) メタスチンまたはその塩、

(2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNA、

- (3) メタスチン受容体またはその塩、
- (4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNA、
- (5) メタスチンの発現を促進する物質、または
- (6) メタスチン受容体の発現を促進する物質の使用、
- 5 〔72〕血糖低下剤を製造するための
 - (1) メタスチンまたはその塩に対する抗体、
 - (2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNA、
 - (3) メタスチン受容体またはその塩に対する抗体、
 - 10 (4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNA、
 - (5) メタスチン受容体に対するアンタゴニスト、
 - (6) メタスチンの発現を抑制する物質、または
 - (7) メタスチン受容体の発現を抑制する物質の使用、
 - 15 〔73〕膵グルカゴン分泌抑制剤を製造するための
 - (1) メタスチンまたはその塩に対する抗体、
 - (2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNA、
 - (3) メタスチン受容体またはその塩に対する抗体、
 - 20 (4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNA、
 - (5) メタスチン受容体に対するアンタゴニスト、
 - (6) メタスチンの発現を抑制する物質、または
 - (7) メタスチン受容体の発現を抑制する物質の使用、
 - 25 〔74〕糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤を製造するための
 - (1) メタスチンまたはその塩に対する抗体、

- (2) メタスチンをコードするDNAを含有するDNAに対するアンチセンスDNA、
- (3) メタスチン受容体またはその塩に対する抗体、
- (4) メタスチン受容体をコードするDNAを含有するDNAに対する
5 アンチセンスDNA、
- (5) メタスチン受容体に対するアンタゴニスト、
- (6) メタスチンの発現を抑制する物質、または
- (7) メタスチン受容体の発現を抑制する物質の使用、
- [75] (a) メタスチンおよび(または) (b) メタスチン受容体 (10 以下、部分ペプチドも含む) を用いることを特徴とする血糖調節薬、膵グルカゴン調節薬または尿生成調節薬のスクリーニング方法、
- [76] (a) メタスチンをコードするDNAを含有するDNAおよび
(または) (b) メタスチン受容体をコードするDNAを用いることを
特徴とする血糖調節薬、膵グルカゴン調節薬または尿生成調節薬のスク
15 リーニング方法、
- [77] 標識したメタスチンをメタスチン受容体に接触させた場合と、
標識したメタスチンおよび試験化合物をメタスチン受容体に接触させた
場合における、標識したメタスチンのメタスチン受容体に対する結合量
を測定し、比較することを特徴とするメタスチンとメタスチン受容体と
20 の結合性を変化させる物質のスクリーニング方法、
- [78] 標識したメタスチンをメタスチン受容体を含有する細胞または
該細胞の膜面分に接触させた場合と、標識したメタスチンおよび試験化
合物をメタスチン受容体を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触さ
せた場合における、標識したメタスチンの該細胞または該膜面分に対す
25 る結合量を測定し、比較することを特徴とするメタスチンとメタスチン
受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法、
- [79] 標識したメタスチンを、メタスチン受容体をコードするDNA
を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したメタ
スチン受容体に接触させた場合と、標識したメタスチンおよび試験化合

物をメタスチン受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したメタスチン受容体に接触させた場合における、標識したメタスチンの該メタスチン受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするメタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法、

〔80〕メタスチン受容体を活性化する化合物（例えば、メタスチン、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグ）をメタスチン受容体を含有する細胞（例、CHO細胞、ヒト大腸癌由来細胞株SW620細胞）に接触させた場合と、メタスチン受容体を活性化する化合物および試験化合物をメタスチン受容体を含有する細胞に接触させた場合における、メタスチン受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするメタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法、

〔81〕メタスチン受容体を活性化する化合物（例えば、メタスチン、上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグ）をメタスチン受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したメタスチン受容体に接触させた場合と、メタスチン受容体を活性化する化合物および試験化合物をメタスチン受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したメタスチン受容体に接触させた場合における、メタスチン受容体を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするメタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法、

〔82〕試験化合物をメタスチン受容体を含有する細胞に接触させた場合における、メタスチン受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするメタスチン受容体アゴニストのスクリーニング方法、

〔83〕試験化合物をメタスチン受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したメタスチン受容

体に接触させた場合における、メタスチン受容体を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするメタスチン受容体アゴニストのスクリーニング方法、

〔84〕細胞刺激活性が細胞内 Ca^{2+} 遊離の促進活性、細胞増殖阻害活性、遊走阻害活性、腫瘍増殖抑制活性、血糖上昇活性または膵グルカゴン分泌促進活性である上記〔80〕～〔83〕記載のスクリーニング方法、

〔85〕（a）上記〔1〕記載のメタスチン誘導体（I）またはその塩あるいはそのプロドラッグおよび（または）（b）メタスチン受容体を用いることを特徴とするメタスチン受容体アゴニストまたはメタスチン受容体アンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

上記式中、 Z^1 、 Z^3 、 Z^5 および Z^7 はそれぞれ水素原子または C_{1-3} アルキル基を、 Z^2 、 Z^4 、 Z^6 および Z^8 はそれぞれ水素原子、OまたはSを示す。

C_{1-3} アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基が用いられる。

$Z^1 \sim Z^8$ の組み合わせとしては、 Z^1 および Z^3 が水素原子で、 Z^5 および Z^7 がそれぞれ水素原子または C_{1-3} アルキル基で、 Z^2 、 Z^4 、 Z^6 および Z^8 がそれぞれOまたはSを示す場合も好ましい。

$Z^1 \sim Z^8$ のより好ましい組み合わせとしては、

（a） Z^1 が水素原子、 Z^3 が水素原子、 Z^5 が水素原子、 Z^7 が水素原子であり、 Z^2 がO、 Z^4 がO、 Z^6 がO、 Z^8 がOである場合、

（b） Z^1 が水素原子、 Z^3 が水素原子、 Z^5 が水素原子、 Z^7 が水素原子であり、 Z^2 がO、 Z^4 がO、 Z^6 がO、 Z^8 がSである場合、

（c） Z^1 および Z^3 が水素原子であり、 Z^5 が水素原子で、 Z^7 がメチル基であり、 Z^2 がOで、 Z^4 がOで、 Z^6 がOで、 Z^8 がOである場合などが挙げられる。なかでも、（a）と（b）の場合が好ましい。

R^1 は（1）水素原子または（2）置換されていてもよいカルバモイル基、置換されていてもよいヒドロキシル基および置換されていてもよ

い芳香族環基から成る群から選ばれる基で置換されていてもよい C_{1-8} アルキル基を示し、なかでも(1)水素原子または(2)置換されていてもよいカルバモイル基、置換されていてもよいヒドロキシル基および置換されていてもよい芳香族環基から成る群から選ばれる基で置換されている C_{1-8} アルキル基が好ましい。

「 C_{1-8} アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチルなどの鎖状 C_{1-8} アルキル基やシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの環状 C_{3-8} アルキル基などが用いられる。なかでもメチル、エチルなどの C_{1-3} アルキル基が好ましい。

「置換されていてもよいカルバモイル基」としては、例えば、カルバモイル、モノー C_{1-6} アルキルカルバモイル基(例、メチルカルバモイル、エチルカルバモイル等)、ジー C_{1-6} アルキルカルバモイル基(例、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、エチルメチルカルバモイル等)、モノーまたはジー C_{6-14} アリールカルバモイル基(例、フェニルカルバモイル、1-ナフチルカルバモイル、2-ナフチルカルバモイル等)、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含むモノーまたはジ

15

20

ー5ないし7員複素環カルバモイル基(例、2-ピリジルカルバモイル、3-ピリジルカルバモイル、4-ピリジルカルバモイル、2-チエニルカルバモイル、3-チエニルカルバモイル等)などが用いられる。

「置換されていてもよいヒドロキシル基」としては、例えば、ヒドロキシ基、置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ基、置換されていてもよい C_{6-14} アリールオキシ基、置換されていてもよい C_{7-16} アラルキルオキシ基などが用いられる。「置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ基」、「置換されていてもよい C_{6-14} アリールオキシ基」および「置換されていてもよい C_{7-16} アラルキルオキシ基」としては、後述する置換基A群の「置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ基」、「置

25

換されていてもよい C_{6-14} アリールオキシ基」および「置換されていてもよい C_{7-16} アラルキルオキシ基」と同様のものが用いられる。

「置換されていてもよい芳香族環基」の「芳香族環基」としては、例えば、芳香族炭化水素基、芳香族複素環基、芳香族縮合環基、芳香族縮合複素環基などが用いられる。

「芳香族炭化水素基」としては、例えば、フェニル、2-ビフェニル、3-ビフェニル、4-ビフェニル、シクロオクタテトラエニルなどの C_{6-14} アリール基が用いられる。

「芳香族複素環基」としては、例えば、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員、好ましくは5ないし10員、より好ましくは5または6員の芳香族複素環基が用いられる。具体的には、例えば、チエニル（例、2-チエニル、3-チエニル）、フリル（例、2-フリル、3-フリル）、ピリジル（例、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル）、チアゾリル（例、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル）、オキサゾリル（例、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル）、ピラジニル、ピリミジニル（例、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル）、ピロリル（例、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル）、イミダゾリル（例、1-イミダゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル）、ピラゾリル（例、1-ピラゾリル、3-ピラゾリル、4-ピラゾリル）、ピリダジニル（例、3-ピリダジニル、4-ピリダジニル）、イソチアゾリル（例、3-イソチアゾリル）、イソオキサゾリル（例、3-イソオキサゾリル）などが用いられる。

「芳香族縮合環基」としては、ナフチル（例、1-ナフチル、2-ナフチル）、アンスリル（例、2-アンスリル、9-アンスリル）などの C_{8-14} 芳香族縮合環基が用いられる。

「芳香族縮合複素環基」としては、例えば、3ないし11個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員（好ましくは5ないし

10員)の2環または3環式の芳香族複素環基、または炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員(好ましくは5ないし10員)の7ないし10員芳香族複素架橋環から任意の1個の水素原子を除いて
5 できる1価の基が用いられる。具体的には、例えば、キノリル(例、2-キノリル、3-キノリル、4-キノリル、5-キノリル、8-キノリル)、イソキノリル(例、1-イソキノリル、3-イソキノリル、4-イソキノリル、5-イソキノリル)、インドリル(例、1-インドリル、2-インドリル、3-インドリル)、2-ベンゾチアゾリル、ベンゾ
10 [b]チエニル、(例、2-ベンゾ[b]チエニル、3-ベンゾ[b]チエニル)、ベンゾ[b]フラニル(例、2-ベンゾ[b]フラニル、3-ベンゾ[b]フラニル)などが用いられる。

「芳香族環基」の「置換基」としては、後述する置換基A群から選ばれる置換基が用いられる。

15 R^1 としては、例えば、水素原子、カルバモイルメチル、2-カルバモイルエチル、ヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチル、ベンジル、4-ヒドロキシベンジル、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、2-チエニルメチル、3-チエニルメチル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、3-インドールメチル、メチル
20 、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、シクロヘキシルメチルなどが用いられ、なかでもヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチル、ベンジル、4-ヒドロキシベンジル、3-インドールメチル、メチル、イソブチルなどが好ましく、特にヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチルなどが好ましい。

25 R^2 は(1)水素原子、(2)環状または鎖状の C_{1-10} アルキル基または(3)環状アルキル基と鎖状アルキル基からなる C_{1-10} アルキル基を示す。

環状の C_{1-10} アルキル基としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキ

ル基などが用いられる。

鎖状の C_{1-10} アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、プロ
ピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル
、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オク
5 チル、ノナニル、デカニルなどが用いられる。

環状アルキル基と鎖状アルキル基からなる C_{1-10} アルキル基として
は、例えば、シクロペンチルメチル、シクロヘキシルメチルなどの C_3
- $_7$ シクロアルキル- C_{1-3} アルキル基などが用いられる。

R^2 としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、
10 ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、シクロヘキシルメチ
ルなどが用いられ、なかでもメチル、エチル、イソプロピル、イソブチ
ル、sec-ブチル、tert-ブチルなどが好ましく、特にイソプロピル、イ
ソブチルなどが好ましい。

R^3 は (1) 置換されていてもよい塩基性基を有し、さらに他の置換
15 基を有していてもよい C_{1-8} アルキル基、

(2) 置換されていてもよい塩基性基を有し、さらに他の置換基を有し
ていてもよいアラルキル基、

(3) 置換されていてもよい塩基性基を有している炭素数 7 以下の非芳
香性環状炭化水素基を有し、さらに他の置換基を有していてもよい C_{1-4}
20 - $_4$ アルキル基、または

(4) 置換されていてもよい塩基性基を有している炭素数 7 以下の非芳
香性複素環基を有し、さらに他の置換基を有していてもよい C_{1-4} アル
キル基を示す。

「置換されていてもよい塩基性基」としては、例えば、(1) 1 また
25 は 2 個の C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アシル (例、メチル、エチル、プロピ
ル、イソプロピル、ブチル、アセチル、プロピオニルなど) などを有し
ていてもよいグアニジノ基、(2) 1 ないし 3 個の C_{1-6} アルキル、 C_{1-6}
アシル (例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、
アセチル、プロピオニルなど) などを有していてもよいアミノ基、(3

5) 1 または 2 個の C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アシル（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、アセチル、プロピオニルなど）などを有していてもよいグアニジノ基で置換されていてもよい C_{1-6} アルキルカルボニル-アミノ基（例、アセトアミド）、（4）1 ないし 3 個の C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アシル（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、アセチル、プロピオニルなど）などを有していてもよいアミノ基で置換されていてもよい C_{1-6} アルキルカルボニル-アミノ基（例、アセトアミド）などが用いられる。なかでも、グアニジノ、N-メチルグアニジノ、N, N-ジメチルグアニジノ、N, N'-ジメチルグアニジノ、N-エチルグアニジノ、N-アセチルグアニジノ、アミノ、N-メチルアミノ、N, N-ジメチルアミノ、アミノアセタミド、グアニジノアセタミド、アミジノなどが好ましい。

「置換されていてもよい塩基性基」以外の他の「他の置換基」としては、後述する置換基 A 群から選ばれる置換基が用いられる。

15 「 C_{1-8} アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチルなどが用いられる。

20 「アラルキル基」としては、例えば、ベンジル、フェネチル、ジフェニルメチル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、2, 2-ジフェニルエチル、3-フェニルプロピル、4-フェニルブチル、5-フェニルペンチル、2-ビフェニリルメチル、3-ビフェニリルメチル、4-ビフェニリルメチルなどの C_{7-16} アラルキル基などが用いられる。

25 「炭素数 7 以下の非芳香性環状炭化水素基」としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-7} シクロアルキル基などが用いられる。

「炭素数 7 以下の非芳香性複素環基」としては、例えば、1 ないし 7 個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる 1 または 2 種、1 ないし 4 個のヘテロ原子を含む 5 ないし 10 員非芳香性複

素環基などが用いられる。具体的には、例えばピロリジニル（例、1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル）、オキサゾリジニル（例、2-オキサゾリジニル）、イミダゾリニル（例、1-イミダゾリニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル）、ピペリジニル（例、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-ピペリジニル）、ピペラジニル（例、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル）、モルホリノ、チオモルホリノなどが用いられる。

「C₁₋₄アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチルなどが用いられる。

R³としては、例えば、（1）3-グアニジノプロピル、3-（N-メチルグアニジノ）プロピル、3-（N，N-ジメチルグアニジノ）プロピル、3-（N，N'-ジメチルグアニジノ）プロピル、3-（N-エチルグアニジノ）プロピル、3-（N-プロピルグアニジノ）プロピル、3-（N-アセチルグアニジノ）プロピル、4-グアニジノブチル、4-（N-メチルグアニジノ）ブチル、2-グアニジノエチル、2-（N-メチルグアニジノ）エチル、4-アミノブチル、4-（N-メチルアミノ）ブチル、4-（N，N-ジメチルアミノ）ブチル、3-アミノプロピル、2-アミノエチル、アミノメチル、アミノアセタミドメチル、グアニジノアセタミドメチル、2-（グアニジノカルボニル）エチル、（2）4-グアニジノベンジル、4-アミノベンジル、（3）4-グアニジノシクロヘキシルメチル、4-アミノシクロヘキシルメチル、（4）1-アミジノピペリジン-4-イルメチルなどが用いられ、なかでも3-グアニジノプロピル、3-（N-メチルグアニジノ）プロピル、3-（N，N-ジメチルグアニジノ）プロピル、3-（N，N'-ジメチルグアニジノ）プロピル、3-（N-エチルグアニジノ）プロピル、3-（N-プロピルグアニジノ）プロピル、3-（N-アセチルグアニジノ）プロピル、4-グアニジノブチル、4-（N-メチルグアニジノ）ブチル、2-グアニジノエチル、2-（N-メチルグアニジノ）エ

- チル、4-アミノブチル、4-(N-メチルアミノ)ブチル、4-(N, N-ジメチルアミノ)ブチル、3-アミノプロピル、2-アミノエチル、4-アミノベンジル、アミノアセタミドメチル、グアニジノアセタミドメチルなどが好ましく、特に、3-グアニジノプロピル、3-(N-メチルグアニジノ)プロピル、3-(N, N-ジメチルグアニジノ)プロピル、3-(N, N'-ジメチルグアニジノ)プロピル、3-(N-エチルグアニジノ)プロピル、3-(N-アセチルグアニジノ)プロピル、4-グアニジノブチル、4-(N-メチルグアニジノ)ブチル、2-グアニジノエチル、4-アミノブチルなどが好ましい。
- 10 R⁴は(1)置換されていてもよいC₆₋₁₂芳香族炭化水素基、
(2)置換されていてもよい、1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族複素環基、
(3)置換されていてもよいC₈₋₁₄芳香族縮合環基、
15 (4)置換されていてもよい、3ないし11個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族縮合複素環基、
(5)置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基、および
20 (6)置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基、
から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよいC₁₋₄アルキル基を示し、なかでも
(1)置換されていてもよいC₆₋₁₂芳香族炭化水素基、
(2)置換されていてもよい、1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、
25 酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族複素環基、
(3)置換されていてもよいC₈₋₁₄芳香族縮合環基、
(4)置換されていてもよい、3ないし11個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからな

る5ないし14員芳香族縮合複素環基、

(5) 置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基、および

(6) 置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基、

- 5 から成る群から選ばれる置換基で置換されている C_{1-4} アルキル基が好ましい。

「 C_{1-4} アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチルなどが用いられる。

- 10 「 C_{6-12} 芳香族炭化水素基」としては、例えば、フェニル、シクロオクタテトラエニルなどの単環式の C_{6-12} 芳香族炭化水素基などが用いられる。

- 「1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族複素環基」としては、例えば、1ないし7個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員、好ましくは5ないし10員、より好ましくは5または6員の単環式の芳香族複素環基が用いられる。具体的には、
- 15 例えばチエニル（例、2-チエニル、3-チエニル）、フリル（例、2-フリル、3-フリル）、ピリジル（例、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル）、チアゾリル（例、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル）、オキサゾリル（例、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル）、ピラジニル、ピリミジニル（例、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル）、ピロリル（例、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル）、イミダゾリル（例、1-イミダゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル）、ピラゾリル（例、1-ピラゾリル、3-ピラゾリル、4-ピラゾリル）、ピリダジニル（例、3-ピリダジニル、4-ピリダジニル）、イソチアゾリル（例、3-イソチアゾリル）、イソオキサゾリル（例、3-イソオキサゾリル）などが用いられる。
- 25

「 C_{8-14} 芳香族縮合環基」としては、例えば、ナフチル（例、1-ナフチル、2-ナフチル）、アンスリル（例、2-アンスリル、9-アンスリル）などが用いられる。

「3ないし11個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族縮合複素環基」としては、例えば、3ないし11個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員（好ましくは5ないし10員）の2環または3環式の芳香族複素環基、または炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員（好ましくは5ないし10員）の7ないし10員芳香族複素架橋環から任意の1個の水素原子を除いてできる1価の基が用いられる。具体的には、例えばキノリル（例、2-キノリル、3-キノリル、4-キノリル、5-キノリル、8-キノリル）、イソキノリル（例、1-イソキノリル、3-イソキノリル、4-イソキノリル、5-イソキノリル）、インドリル（例、1-インドリル、2-インドリル、3-インドリル）、2-ベンゾチアゾリル、ベンゾ[b]チエニル、（例、2-ベンゾ[b]チエニル、3-ベンゾ[b]チエニル）、ベンゾ[b]フラニル（例、2-ベンゾ[b]フラニル、3-ベンゾ[b]フラニル）などが用いられる。

「炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基」としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-7} シクロアルキル基などが用いられる。

「炭素数7以下の非芳香性複素環基」としては、ピロリジニル（例、1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル）、オキサゾリジニル（例、2-オキサゾリジニル）、イミダゾリニル（例、1-イミダゾリニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル）、ピペリジニル（例、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-ピペリジニル）、ピペラジニル（例、1-ピペラジニル、2-ピペ

ラジニル)、モルホリノ、チオモルホリノなどの1ないし7個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし10員の非芳香性複素環基などが用いられる。

- 5 これら「 C_{6-12} 芳香族炭化水素基」、「1ないし7個の炭素原子と窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族複素環基」、「 C_{8-14} 芳香族縮合環基」、「3ないし11個の炭素原子と窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族縮合複素環基」、「炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基」および「炭素数7以下の非芳香性複素環基」の置換基としては、例えば、オキソ、ハロゲン原子(例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素等)、 C_{1-3} アルキレンジオキシ(例、メチレンジオキシ、エチレンジオキシ等)、ニトロ、シアノ、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル、置換されていてもよい C_{2-6} アルケニル、置換されていてもよい C_{2-6} アルキニル、置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル、置換されていてもよい C_{6-14} アリール、置換されていてもよい C_{7-16} アラルキル、置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ、ヒドロキシ、置換されていてもよい C_{6-14} アリールオキシ、置換されていてもよい C_{7-16} アラルキルオキシ、メルカプト、置換されていてもよい C_{1-6} アルキルチオ、置換されていてもよい C_{6-14} アリールチオ、置換されていてもよい C_{7-16} アラルキルチオ、置換されていてもよいアミノ[アミノ、置換されていてもよいモノ又はジ- C_{1-6} アルキル-アミノ(例、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、プロピルアミノ、イソプロピルアミノ等)、置換されていてもよいモノ又はジ- C_{2-6} アルケニル-アミノ(例、ビニルアミノ、プロペニルアミノ、イソプロペニルアミノ)、置換されていてもよい C_{2-6} アルキニル-アミノ(例、2-ブチン-1-イル-アミノ、4-ペンチン-1-イル-アミノ、5-ヘキシ-1-イル-アミノ)、置換されていてもよいモノ又はジ- C_{3-8} シクロ
- 10
- 15
- 20
- 25

アルキル-アミノ（例、シクロプロピルアミノ、シクロヘキシルアミノ）、置換されていてもよい C_{6-14} アリール-アミノ（例、フェニルアミノ、ジフェニルアミノ、ナフチルアミノ）、置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ-アミノ（例、メトキシアミノ、エトキシアミノ、プロポキシアミノ、イソプロポキシアミノ）、ホルミルアミノ、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル-カルボニルアミノ（例、アセチルアミノ、プロピオニルアミノ、ピバロイルアミノ等）、置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル-カルボニルアミノ（例、シクロプロピルカルボニルアミノ、シクロペンチルカルボニルアミノ、シクロヘキシルカルボニルアミノ等）、置換されていてもよい C_{6-14} アリール-カルボニルアミノ（例、ベンゾイルアミノ、ナフトイルアミノ等）、置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ-カルボニルアミノ（例、メトキシカルボニルアミノ、エトキシカルボニルアミノ、プロポキシカルボニルアミノ、ブトキシカルボニルアミノ等）、置換されていてもよい C_{1-6} アルキルスルホニルアミノ（例、メチルスルホニルアミノ、エチルスルホニルアミノ等）、置換されていてもよい C_{6-14} アリールスルホニルアミノ（例、フェニルスルホニルアミノ、2-ナフチルスルホニルアミノ、1-ナフチルスルホニルアミノ等）]、ホルミル、カルボキシ、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル-カルボニル（例、アセチル、プロピオニル、ピバロイル等）、置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル-カルボニル（例、シクロプロピルカルボニル、シクロペンチルカルボニル、シクロヘキシルカルボニル、1-メチル-シクロヘキシル-カルボニル等）、置換されていてもよい C_{6-14} アリール-カルボニル（例、ベンゾイル、1-ナフトイル、2-ナフトイル等）、置換されていてもよい C_{7-16} アラールキル-カルボニル（例、フェニルアセチル、3-フェニルプロピオニル等）、置換されていてもよい、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし7員複素環カルボニル（例、ニコチノイル、イソニコチノイル、テノイル、フロイル、モルホリノカルボニル、チオモル

ホリノカルボニル、ピペラジン-1-イルカルボニル、ピロリジン-1-イルカルボニル等)、エステル化されていてもよいカルボキシル、置換されていてもよいカルバモイル基、置換されていてもよいC₁₋₆アルキルスルホニル(例、メチルスルホニル、エチルスルホニル等)、置換されていてもよいC₁₋₆アルキルスルフィニル(例、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル等)、置換されていてもよいC₆₋₁₄アリールスルホニル(例、フェニルスルホニル、1-ナフチルスルホニル、2-ナフチルスルホニル等)、置換されていてもよいC₆₋₁₄アリールスルフィニル(例、フェニルスルフィニル、1-ナフチルスルフィニル、2-ナフチルスルフィニル等)、置換されていてもよいC₁₋₆アルキル-カルボニルオキシ(例、アセトキシ、プロピオニルオキシ等)、置換されていてもよいC₆₋₁₄アリール-カルボニルオキシ(例、ベンゾイルオキシ、ナフチルカルボニルオキシ等)、置換されていてもよいC₁₋₆アルコキシ-カルボニルオキシ(例、メトキシカルボニルオキシ、エトキシカルボニルオキシ、プロポキシカルボニルオキシ、ブトキシカルボニルオキシ等)、置換されていてもよいモノ-C₁₋₆アルキルカルバモイルオキシ(例、メチルカルバモイルオキシ、エチルカルバモイルオキシ等)、置換されていてもよいジ-C₁₋₆アルキルカルバモイルオキシ(例、ジメチルカルバモイルオキシ、ジエチルカルバモイルオキシ等)、置換されていてもよいモノ-またはジ-C₆₋₁₄アリールカルバモイルオキシ(例、フェニルカルバモイルオキシ、ナフチルカルバモイルオキシ等)、置換されていてもよい複素環基、スルホ、スルファモイル、スルフィナモイル、スルフェナモイル、またはこれらの置換基が2個以上(例、2~3個)結合した基などから選ばれる置換基(置換基A群)が用いられる。置換基の数は特に限定されないが、置換可能な位置に1ないし5個、好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換基数が2個以上の場合、各置換基は同一または異なってもよい。

置換基A群の「エステル化されていてもよいカルボキシル基」としては、例えば置換されていてもよいC₁₋₆アルコキシ-カルボニル(例、

メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、
tert-ブトキシカルボニル等)、置換されていてもよい C_{6-14} アリール
オキシカルボニル(例、フェノキシカルボニル等)、置換されてい
てもよい C_{7-16} アラルキルオキシカルボニル(例、ベンジルオキシカ
5 ルボニル、フェネチルオキシカルボニル等)などが用いられる。

置換基A群の「置換されていてもよい C_{1-6} アルキル」の「 C_{1-6} アルキル」としては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、
ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペン
チル、ネオペンチル、ヘキシルなどが用いられる。

10 置換基A群の「置換されていてもよい C_{2-6} アルケニル」の「 C_{2-6} アルケニル」としては、例えばビニル、プロペニル、イソプロペニル、
2-ブテン-1-イル、4-ペンテン-1-イル、5-ヘキセン-1-イルなどが用いられる。

置換基A群の「置換されていてもよい C_{2-6} アルキニル」の「 C_{2-6}
15 アルキニル」としては、例えば2-ブチン-1-イル、4-ペンチン-1-イル、5-ヘキシン-1-イルなどが用いられる。

置換基A群の「置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル」の「 C_{3-8} シクロアルキル」としては、例えばシクロプロピル、シクロブチル、
シクロペンチル、シクロヘキシルなどが用いられる。

20 置換基A群の「置換されていてもよい C_{6-14} アリール」の「 C_{6-14} アリール」としては、例えばフェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、
2-ビフェニリル、3-ビフェニリル、4-ビフェニリル、2-アン
スリルなどが用いられる。

置換基A群の「置換されていてもよい C_{7-16} アラルキル」の「 C_{7-16}
25 アラルキル」としては、ベンジル、フェネチル、ジフェニルメチル、
1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、2, 2-ジフェニルエチ
ル、3-フェニルプロピル、4-フェニルブチル、5-フェニルペンチ
ル、2-ビフェニリルメチル、3-ビフェニリルメチル、4-ビフェニ
リルメチル)などが用いられる。

置換基 A 群の「置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ」の「 C_{1-6} アルコキシ」としては、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシなどが用いられる。

- 5 置換基 A 群の「置換されていてもよい C_{6-14} アリールオキシ」の「 C_{6-14} アリールオキシ」としては、例えば、フェニルオキシ、1-ナフチルオキシ、2-ナフチルオキシなどが用いられる。

置換基 A 群の「置換されていてもよい C_{7-16} アラルキルオキシ」の「 C_{7-16} アラルキルオキシ」としては、例えば、ベンジルオキシ、フェネチルオキシなどが用いられる。

置換基 A 群の「置換されていてもよい C_{1-6} アルキルチオ」の「 C_{1-6} アルキルチオ」としては、例えばメチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、sec-ブチルチオ、tert-ブチルチオなどが用いられる。

- 15 置換基 A 群の「置換されていてもよい C_{6-14} アリールチオ」の「 C_{6-14} アリールチオ」としては、例えばフェニルチオ、1-ナフチルチオ、2-ナフチルチオなどが用いられる。

置換基 A 群の「置換されていてもよい C_{7-16} アラルキルチオ」の「 C_{7-16} アラルキルチオ」としては、例えばベンジルチオ、フェネチルチオなどが用いられる。

これら「 C_{1-6} アルコキシ-カルボニル」、「 C_{1-6} アルキル基」、「 C_{2-6} アルケニル」、「 C_{2-6} アルキニル」、「 C_{1-6} アルコキシ」、「 C_{1-6} アルキルチオ」、 C_{1-6} アルキル-アミノ、 C_{2-6} アルケニル-アミノ、 C_{2-6} アルキニル-アミノ、 C_{1-6} アルコキシ-アミノ、
25 「 C_{1-6} アルキル-カルボニル」、「 C_{1-6} アルキルスルホニル」、「 C_{1-6} アルキルスルフィニル」、「 C_{1-6} アルキル-カルボニルアミノ」、「 C_{1-6} アルコキシ-カルボニルアミノ」、「 C_{1-6} アルキルスルホニルアミノ」、「 C_{1-6} アルキル-カルボニルオキシ」、「 C_{1-6} アルコキシ-カルボニルオキシ」、「モノ- C_{1-6} アルキルカルバモイ

ルオキシ」、「ジ- C_{1-6} アルキルカルバモイルオキシ」の置換基としては、例えばハロゲン原子（例、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子）、カルボキシ、ヒドロキシ、アミノ、モノーまたはジ- C_{1-6} アルキルアミノ、モノーまたはジ- C_{6-14} アリールアミノ、 C_{3-8} シクロアルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルコキシカルボニル、
 C_{1-6} アルキルチオ、 C_{1-6} アルキルスルフィニル、 C_{1-6} アルキルスルホニル、上記したエステル化されていてもよいカルボキシル、カルバモイル、チオカルバモイル、モノ- C_{1-6} アルキルカルバモイル（例、メチルカルバモイル、エチルカルバモイル等）、ジ- C_{1-6} アルキルカルバモイル（例、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、エチルメチルカルバモイル等）、モノーまたはジ- C_{6-14} アリールカルバモイル（例、フェニルカルバモイル、1-ナフチルカルバモイル、2-ナフチルカルバモイル等）、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含むモノーまたはジ-5ないし7員複素環カルバモイル（例、2-ピリジルカルバモイル、3-ピリジルカルバモイル、4-ピリジルカルバモイル、2-チエニルカルバモイル、3-チエニルカルバモイル等）などから選ばれる1ないし5個の置換基が用いられる。

置換基A群の「 C_{6-14} アリールオキシカルボニル」、「 C_{7-16} アラルキルオキシカルボニル」、「 C_{3-8} シクロアルキル」、「 C_{6-14} アリール」、「 C_{7-16} アラルキル」、「 C_{6-14} アリールオキシ」、「 C_{7-16} アラルキルオキシ」、「 C_{6-14} アリールチオ」、「 C_{7-16} アラルキルチオ」、 C_{3-8} シクロアルキル-アミノ、 C_{6-14} アリール-アミノ、「 C_{3-8} シクロアルキル-カルボニル」、「 C_{6-14} アリール-カルボニル」、「 C_{7-16} アラルキル-カルボニル」、「炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし7員複素環カルボニル」、「 C_{6-14} アリールスルホニル」、「 C_{6-14} アリールスルフィニル」、「 C_{3-8} シクロアルキル-カルボニルアミノ」、「 C_{6-14} アリール-

カルボニルアミノ」、「 C_{6-14} アリールスルホニルアミノ」、「 C_{6-14} アリールカルボニルオキシ」、「モノーまたはジ- C_{6-14} アリールカルバモイルオキシ」の置換基としては、例えばハロゲン原子、ヒドロキシ、カルボキシ、ニトロ、シアノ、上記した置換されていてもよい

5 C_{1-6} アルキル、上記した置換されていてもよい C_{2-6} アルケニル、上記した置換されていてもよい C_{2-6} アルキニル、上記した置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル、上記した置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ、上記した置換されていてもよい C_{1-6} アルキルチオ、上記した置換されていてもよい C_{1-6} アルキルスルフィニル、上記した置換

10 されていてもよい C_{1-6} アルキルスルホニル、上記したエステル化されていてもよいカルボキシル、カルバモイル、チオカルバモイル、モノ- C_{1-6} アルキルカルバモイル、ジ- C_{1-6} アルキルカルバモイル、モノーまたはジ- C_{6-14} アリールカルバモイル、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘ

15 テロ原子を含むモノーまたはジ-5ないし7員複素環カルバモイルなどから選ばれる1ないし5個の置換基が用いられる。

置換基A群の「置換されていてもよい複素環基」としては、例えば、ハロゲン原子、ヒドロキシ、カルボキシ、ニトロ、シアノ、上記した置換されていてもよい C_{1-6} アルキル、上記した置換されていてもよい C_{2-6} アルケニル、上記した置換されていてもよい C_{2-6} アルキニル、上記した置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル、上記した置換されていてもよい C_{6-14} アリール、上記した置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ、上記した置換されていてもよい C_{1-6} アルキルチオ、上記した置換されていてもよい C_{6-14} アリールチオ、上記した置換されて

20 いてもよい C_{7-16} アラルキルチオ、上記した置換されていてもよい C_{1-6} アルキルスルフィニル、上記した置換されていてもよい C_{6-14} アリールスルフィニル、上記した置換されていてもよい C_{1-6} アルキルスルホニル、上記した置換されていてもよい C_{6-14} アリールスルホニル、上記したエステル化されていてもよいカルボキシル、カルバモイル、

25

チオカルバモイル、モノー C_{1-6} アルキルカルバモイル、ジー低級アル
キルカルバモイル、モノーまたはジー C_{6-14} アリールカルバモイル、
炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または
2種、1ないし4個のヘテロ原子を含むモノーまたはジー5ないし7員
5 複素環カルバモイルなどで置換されていてもよい、炭素原子以外に窒素
原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個
のヘテロ原子を含む5ないし14員（単環、2環または3環式）複素環
基、好ましくは（i）5ないし14員（好ましくは5ないし10員）芳
香族複素環基、（ii）5ないし10員非芳香族複素環基または（iii）
10 7ないし10員複素架橋環から任意の1個の水素原子を除いてできる1
価の基などが用いられ、なかでも5員芳香族複素環基が好ましく用いら
れる。具体的には、例えばチエニル（例、2-チエニル、3-チエニル）
、フリル（例、2-フリル、3-フリル）、ピリジル（例、2-ピリ
ジル、3-ピリジル、4-ピリジル）、チアゾリル（例、2-チアゾリ
ル、4-チアゾリル、5-チアゾリル）、オキサゾリル（例、2-オキ
15 サゾリル、4-オキサゾリル）、キノリル（例、2-キノリル、3-キ
ノリル、4-キノリル、5-キノリル、8-キノリル）、イソキノリル
（例、1-イソキノリル、3-イソキノリル、4-イソキノリル、5-
イソキノリル）、ピラジニル、ピリミジニル（例、2-ピリミジニル、
20 4-ピリミジニル）、ピロリル（例、1-ピロリル、2-ピロリル、3-
ピロリル）、イミダゾリル（例、1-イミダゾリル、2-イミダゾリ
ル、4-イミダゾリル）、ピラゾリル（例、1-ピラゾリル、3-ピラ
ゾリル、4-ピラゾリル）、ピリダジニル（例、3-ピリダジニル、4-
ピリダジニル）、イソチアゾリル（例、3-イソチアゾリル）、イソ
25 オキサゾリル（例、3-イソオキサゾリル）、インドリル（例、1-イ
ンドリル、2-インドリル、3-インドリル）、2-ベンゾチアゾリル
、ベンゾ[b]チエニル、（例、2-ベンゾ[b]チエニル、3-ベン
ゾ[b]チエニル）、ベンゾ[b]フラニル（例、2-ベンゾ[b]
フラニル、3-ベンゾ[b]フラニル）などの芳香族複素環基、例えば

ピロリジニル（例、1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル）、オキサゾリジニル（例、2-オキサゾリジニル）、イミダゾリニル（例、1-イミダゾリニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル）、ピペリジニル（例、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-ピペリジニル）、ピペラジニル（例、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル）、モルホリノ、チオモルホリノなどの非芳香族複素環基などが用いられる。

置換基A群の「置換されていてもよいカルバモイル基」としては、上記した置換されていてもよいC₁₋₆アルキル、置換されていてもよいC₂₋₆アルケニル、置換されていてもよいC₂₋₆アルキニル、置換されていてもよいC₃₋₈シクロアルキル、置換されていてもよいC₆₋₁₄アリール、置換されていてもよい複素環基などで置換されていてもよいカルバモイル基が用いられ、具体的には、例えばカルバモイル、チオカルバモイル、モノ-C₁₋₆アルキルカルバモイル（例、メチルカルバモイル、エチルカルバモイル等）、ジ-C₁₋₆アルキルカルバモイル（例、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、エチルメチルカルバモイル等）、C₁₋₆アルキル（C₁₋₆アルコキシ）カルバモイル（例、メチル（メトキシ）カルバモイル、エチル（メトキシ）カルバモイル）、モノ-またはジ-C₆₋₁₄アリールカルバモイル（例、フェニルカルバモイル、1-ナフチルカルバモイル、2-ナフチルカルバモイル等）、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含むモノ-またはジ-5ないし7員複素環カルバモイル（例、2-ピリジルカルバモイル、3-ピリジルカルバモイル、4-ピリジルカルバモイル、2-チエニルカルバモイル、3-チエニルカルバモイル等）、5ないし7員の環状カルバモイル（例、1-ピロリジニルカルボニル、1-ピペリジニルカルボニル、ヘキサメチレンイミノカルボニル）などが用いられる。

置換基A群の「置換されていてもよいアミノ」としては、上記した置換されていてもよいC₁₋₆アルキル、上記した置換されていてもよいC

2-6アルケニル、上記した置換されていてもよいC₂₋₆アルキニル、上記した置換されていてもよいC₃₋₈シクロアルキル、上記した置換されていてもよいC₆₋₁₄アリール、上記した置換されていてもよいC₁₋₆アルコキシ、ホルミル、上記した置換されていてもよいC₁₋₆アルキル
5 -カルボニル、上記した置換されていてもよいC₃₋₈シクロアルキル-カルボニル、上記した置換されていてもよいC₆₋₁₄アリール-カルボニル、上記した置換されていてもよいC₁₋₆アルコキシ-カルボニル、上記した置換されていてもよいC₁₋₆アルキルスルホニル、置換されていてもよいC₆₋₁₄アリールスルホニル) などから選ばれる1または2
10 個の基で置換されていてもよいアミノが用いられる。

より好ましくは、「C₆₋₁₂芳香族炭化水素基」、「1ないし7個の炭素原子と窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族複素環基」、「C₈₋₁₄芳香族縮合環基」、「3ないし11個の炭素原子と窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族縮合複素環基」、「炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基」および「炭素数7以下の非芳香性複素環基」の置換基としては、ハロゲン原子、ヒドロキシ、C₁₋₆アルコキシ、ハロゲン化されていてもよいC₁₋₆アルキル、ハロゲン化されていてもよいC₁₋₆アルコキシ、ア
20 ミノ、ニトロ、シアノなどが好ましい。

R⁴としては、例えば、

(1) ベンジル、2-フルオロベンジル、3-フルオロベンジル、4-フルオロベンジル、4-クロロベンジル、3,4-ジフルオロベンジル、3,4-ジクロロベンジル、ペンタフルオロベンジル、4-ヒドロキシベンジル、4-メトキシベンジル、3-トリフルオロメチルベンジル、
25 4-アミノベンジル、4-ニトロベンジル、4-シアノベンジル、フェネチルなどの「置換されていてもよいC₆₋₁₂芳香族炭化水素基を有しているC₁₋₄アルキル基」、

(2) 2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル

、2-チエニルメチル、3-チエニルメチル、4-チアゾリルメチルなどの「置換されていてもよい、1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族複素環基を有しているC₁₋₄アルキル基」、

- 5 (3) 1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、インデン-2-イルメチルなどの「置換されていてもよいC₈₋₁₄芳香族縮合環基を有しているC₁₋₄アルキル基」、

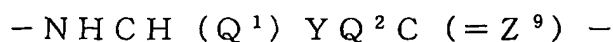
- (4) 3-インドールメチル、1-ホルミルインドール-3-イルメチル、3-ベンゾ[b]チエニルメチル、2-キノリルメチルなどの「置換されていてもよい、3ないし11個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族縮合複素環基を有するC₁₋₄アルキル基」、
- 10

- (5) シクロヘキシルメチル、シクロペンチルメチル、インダン-2-イルメチルなどの「置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基を有するC₁₋₄アルキル基」、
- 15

- (6) 4-ピペリジニルメチル、テトラヒドロフルフリル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロピラン-3-イル、インドリン-3-イルなどの「置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基を有するC₁₋₄アルキル基」などが用いられ、なかでもベンジル、2-フルオロベンジル、3-フルオロベンジル、4-フルオロベンジル、4-ヒドロキシベンジル、4-アミノベンジル、4-ニトロベンジル、4-クロロベンジル、4-メトキシベンジル、4-シアノベンジル、3-トリフルオロメチルベンジル、3,4-ジクロロベンジル、3,4-ジフルオロベンジル、ペンタフルオロベンジル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、3-インドールメチル、1-ホルミルインドール-3-イルメチル、3-ベンゾ[b]チエニルメチル、2-キノリルメチル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、シクロヘキシルメチル、フェネチルなどが好ましく、特にベンジル、2-フルオロベンジル、3-フルオロベンジル、4-フルオロベンジル、4-ヒドロキシベンジ
- 20
- 25

ル、4-アミノベンジル、4-ニトロベンジル、4-クロロベンジル、
 4-メトキシベンジル、4-シアノベンジル、3-トリフルオロメチル
 ベンジル、3, 4-ジクロロベンジル、3, 4-ジフルオロベンジル、
 ペンタフルオロベンジル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、
 5 3-インドールメチル、3-ベンゾ [b] チエニルメチル、1-ナフチ
 ルメチル、2-ナフチルメチル、シクロヘキシルメチルなどが好ましい
 。

Xは式



10 (式中、各記号は前記と同意義を示す) で表わされる基を示す。

Q^1 は(1)置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基、

(2)置換されていてもよい、1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、
 酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる
 5 5ないし14員芳香族複素環基、

15 (3)置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基、

(4)置換されていてもよい、3ないし11個の炭素原子と、窒素原子
 、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからな
 る5ないし14員芳香族縮合複素環基、

(5)置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基、

20 および

(6)置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基、

から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル
 基を示し、 R^4 と同様のものが用いられる。

Q^1 としては、

25 (1)ベンジル、2-フルオロベンジル、3-フルオロベンジル、4-
 フルオロベンジル、4-クロロベンジル、3, 4-ジフルオロベンジル
 、3, 4-ジクロロベンジル、ペンタフルオロベンジル、4-ヒドロキ
 シベンジル、4-メトキシベンジル、4-トリフルオロメチルベンジル
 、4-アミノベンジル、4-ニトロベンジル、4-シアノベンジル、フ

エネチルなどの「置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基を有している C_{1-4} アルキル基」、

(2) 2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、2-チエニルメチル、3-チエニルメチル、4-チアゾリルメチルなどの「置換されていてもよい、1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族複素環基を有している C_{1-4} アルキル基」、

(3) 1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、インデン-2-イルメチルなどの「置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基を有している C_{1-4} アルキル基」、

(4) 3-インドールメチル、1-ホルミルインドール-3-イルメチル、3-ベンゾ[b]チエニルメチル、2-キノリルメチルなどの「置換されていてもよい、3ないし11個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族縮合複素環基を有する C_{1-4} アルキル基」、

(5) シクロヘキシルメチル、シクロペンチルメチル、インダン-2-イルメチルなどの「置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基を有する C_{1-4} アルキル基」、

(6) 4-ピペリジニルメチル、テトラヒドロフルフリル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロピラン-3-イル、インドリン-3-イルなどの「置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基を有する C_{1-4} アルキル基」などが用いられ、なかでもシクロヘキシルメチル、ベンジル、4-フルオロベンジル、4-ヒドロキシベンジル、ペンタフルオロベンジル、2-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチルなどが好ましく、特にベンジル、4-フルオロベンジル、シクロヘキシルメチルなどが好ましい。

Q^2 は(1)カルバモイル基およびヒドロキシ基から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル基で置換されていてもよい CH_2 、(2)カルバモイル基およびヒドロキシ基から成る群か

ら選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル基で置換されていてもよい NH または (3) O を示す。

「 C_{1-4} アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチルなど
5 が用いられる。

Q^2 としては、 CH_2 、 $CH(CH_3)$ 、 $CH(CH_2OH)$ 、NH などが好ましい。

Y は C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい、式 $-CONH-$ 、 $-CSNH-$ 、 $-CH_2NH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-CH_2S$
10 $-$ または $-CH_2CH_2-$ で表わされる基を示す。

「 C_{1-6} アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシルなどが用いられる。

Y としては、式 $-CONH-$ 、 $-CSNH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-CH_2NH-$ で表される基が好ましい。
15

Z^9 は水素原子、O または S を示し、なかでも O、S が好ましい。

P は (1) 水素原子、

(2) 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列（ヒトメタスチンの 54 アミノ酸残基）の第 1～48 番目のアミノ酸配列の C 末端側から任意の
20 連続したまたは不連続に結合したアミノ酸残基、

(3) 式 $J^1 - J^2 - C(J^3)(Q^3)Y^1C(J^4)(Q^4)Y^2C(J^5)(Q^5)Y^3C(J^6)(Q^6)C(=Z^{10}) -$

(式中、各記号は前記と同意義を示す) で表わされる基、

(4) 式 $-J^1 - J^2 - C(J^7)(Q^7)Y^2C(J^8)(Q^8)Y^3C(J^9)(Q^9)C(=Z^{10}) -$
25

(式中、各記号は前記と同意義を示す) で表わされる基、

(5) 式 $J^1 - J^2 - C(J^{10})(Q^{10})Y^3C(J^{11})(Q^{11})C(=Z^{10}) -$

(式中、各記号は前記と同意義を示す) で表わされる基、

(6) 式 $J^1 - J^2 - C(J^{12}) (Q^{12}) C(=Z^{10}) -$

(式中、各記号は前記と同意義を示す) で表わされる基、または

(7) 式 $J^1 -$ (J^1 は前記と同意義を示す) で表わされる基を示す。

「配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第1～48番目のアミノ
5 酸配列のC末端側から任意の連続したまたは不連続に結合したアミノ酸
残基」としては、具体的には、

- (1) Asn-
- (2) Trp Asn-
- (3) Asn Trp Asn-
- 10 (4) Tyr Asn Trp Asn-
- (5) Asn Tyr Asn Trp Asn-
- (6) Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-
- (7) Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-
- (8) Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-
- 15 (9) Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-
- (10) Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-
- (11) Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-
- (12) Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-
- (13) Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-
- 20 (14) Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-
- (15) Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp
Asn-
- (16) Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn
Trp Asn-
- 25 (17) Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr
Asn Trp Asn-
- (18) Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn
Tyr Asn Trp Asn-
- (19) Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro

Asn Tyr Asn Trp Asn-,

(20) Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu
Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

(21) Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp
5 Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

(22) Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys
Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

(23) Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu
Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

10 (24) Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg
Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

(25) Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln
Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

(26) His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val
15 Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

(27) Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu
Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

(28) Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val
Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

20 (29) Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala
Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

(30) Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly
Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-

25 (31) Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln
Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp
Asn-,

(32) Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro
Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn

Trp Asn-

(33) Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala
Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr
Asn Trp Asn-

5 (34) Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro
Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn
Tyr Asn Trp Asn-

(35) Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile
Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro
10 Asn Tyr Asn Trp Asn-

(36) Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln
Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu
Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-

(37) Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg
15 Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp
Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-

(38) Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser
Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys
Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-

20 (39) Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His
Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu
Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-

(40) Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro
His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg
25 Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-

(41) Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala
Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln
Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-

(42) Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser

Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val
Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-

(43) Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu
Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu
5 Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-

(44) Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly
Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val
Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-

(45) Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro
10 Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala
Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-

(46) Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln
Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly
Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-
15 、

(47) Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln
Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln
Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp
Asn-

(48) Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg
20 Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro
Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn
Trp Asn-

などが用いられる。

25 J¹は、(a) 水素原子または (b) 置換基を有していてもよい環基
を含む置換基で置換されていてもよい、(i) C₁₋₁₅アシル基、(ii)
) C₁₋₁₅アルキル基、(iii) C₆₋₁₄アリール基、(iv) カルバモイ
ル基、(v) カルボキシ基、(vi) スルフィノ基、(vii) アミノ基
、または (viii) グリオキシロイル基を示す。

「環基」としては、例えば、「置換されていてもよい芳香族炭化水素基」、「置換されていてもよい芳香族複素環基」、「置換されていてもよい芳香族縮合環基」、「置換されていてもよい芳香族縮合複素環基」、「置換されていてもよい非芳香性環状炭化水素基」、「置換されていてもよい非芳香性複素環基」などが用いられ、「芳香族炭化水素基」、「芳香族複素環基」、「芳香族縮合環基」、「芳香族縮合複素環基」としては、前記と同様のものが用いられる。

「非芳香性環状炭化水素基」としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基などが用いられる。

「非芳香性複素環基」としては、ピロリジニル（例、1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル）、オキサゾリジニル（例、2-オキサゾリジニル）、イミダゾリニル（例、1-イミダゾリニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル）、ピペリジニル（例、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-ピペリジニル）、ピペラジニル（例、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル）、モルホリノ、チオモルホリノなどの1ないし7個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし10員の非芳香性複素環基などが用いられる。

「環基」が有していてもよい置換基としては、前記した置換基A群の置換基と同様のものが用いられる。

「 C_{1-15} アシル基」としては、例えば、ホルミル、 C_{1-14} アルキル-カルボニル（例、アセチル、プロピオニル、ピバロイル等などの C_{1-6} アルキル-カルボニル）などが用いられる。

「 C_{1-15} アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノナニル、デカニルなどが用いられる。

「C₆₋₁₄アリール基」としては、例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、ビフェニルなどが用いられる。

- (1) 環基を含む置換基で置換されていてもよいC₁₋₁₅アシル基としては、(i) ホルミル、(ii) C₁₋₁₄アルキル-カルボニル（例、アセチル、プロピオニル、ピバロイル等などのC₁₋₆アルキル-カルボニル）、(iii) C₃₋₈シクロアルキル-カルボニル（例、シクロプロピルカルボニル、シクロペンチルカルボニル、シクロヘキシルカルボニル、1-メチルシクロヘキシルカルボニル等）、(iv) C₃₋₈シクロアルキル-C₁₋₆アルキル-カルボニル（例えば、シクロプロピルアセチル、シクロペンチルアセチル、シクロヘキシルアセチル等）(v) C₆₋₁₄アリール-カルボニル（例、ベンゾイル、1-ナフトイル、2-ナフトイル等）、C₆₋₁₄アラキル-カルボニル（例、フェニルアセチル、3-フェニルプロピオニル等）、(vi) 炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし7員の単環式複素環カルボニル（例、ニコチノイル、イソニコチノイル、テノイル、フロイル、モルホリノカルボニル、チオモルホリノカルボニル、ピペラジン-1-イルカルボニル、ピロリジン-1-イルカルボニル等）、(vii) 炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし7員の単環式複素環-C₁₋₆アルキルカルボニル（例、3-ピリジルアセチル、4-ピリジルアセチル、2-チエニルアセチル、2-フリルアセチル、モルホリノアセチル、チオモルホリノアセチル、ピペリジン-2-アセチル、ピロリジン-2-イルアセチル等）、(viii) 3ないし11個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員（好ましくは5ないし10員）の2環または3環式の芳香族複素環カルボニル（例えば、2-インドールカルボニル、3-インドールカルボニル、2-キノリルカルボニル、1-イソキノリルカルボニル、2-ベンゾ[b]チエニルカルボニル、2-ベンゾ[b]フラニルカル

- ボニル等)、(ix) 3 ないし 11 個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる 1 または 2 種、1 ないし 4 個のヘテロ原子を含む 5 ないし 14 員(好ましくは 5 ないし 10 員)の 2 環または 3 環式の芳香族複素環-C₁₋₆アルキルカルボニル(例えば、2-インドールアセチル、3-インドールアセチル、2-キノリルアセチル、1-イソキノリルアセチル、2-ベンゾ[b]チエニルアセチル、2-ベンゾ[b]フラニルアセチル等)などが用いられ、なかでもアセチル、2-インドールカルボニル、3-インドールカルボニル、3-インドールアセチル、3-インドールプロピオニル、2-インドリンカルボニル、3-フェニルプロピオニル、ジフェニルアセチル、2-ピリジンカルボニル、, 3-ピリジンカルボニル、, 4-ピリジンカルボニル、1-ピリジニオアセチル、2-ピリジンアセチル、, 3-ピリジンアセチル、, 4-ピリジンアセチル、3-(1-ピリジニオ)プロピオニル、3-(ピリジン-2-イル)プロピオニル、3-(ピリジン-3-イル)プロピオニル、3-(ピリジン-4-イル)プロピオニル、4-イミダゾールアセチル、シクロヘキサンカルボニル、1-ピペリジンアセチル、1-メチル-1-ピペリジニオアセチル、4-ピペリジンカルボニル、2-ピリミジンカルボニル、4-ピリミジンカルボニル、5-ピリミジンカルボニル、2-ピリミジンアセチル、4-ピリミジンアセチル、5-ピリミジンアセチル、3-(ピリミジン-2-イル)プロピオニル、3-(ピリミジン-4-イル)プロピオニル、3-(ピリミジン-5-イル)プロピオニル、ブタノイル、ヘキサノイル、オクタノイル、D-グルクロニル、アミノ-(4-ヒドロキシフェニル)アセチル)などが好ましく用いられる。
- (2) 環基を含む置換基で置換されていてもよい C₁₋₁₅アルキル基としては、例えば、(i) モノ-またはジ-C₁₋₁₅アルキル(例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノナニル、デカニル)、(ii) モノ-またはジ

ーC₃₋₈シクロアルキル（例、シクロプロピル、シクロペンチル等）、
（iii）モノーまたはジーC₃₋₈シクロアルキルーC₁₋₇アルキル（例えば、シクロプロピルメチル、シクロペンチルメチル、シクロヘキシルエチル等）、（iv）モノーまたはジーC₇₋₁₅アラルキル（例、ベンジル、
5 フェネチル等）、（v）炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含むモノーまたはジー5ないし7員の単環式複素環ーC₁₋₆アルキル基（例、3ーピリジルメチル、4ーピリジルメチル、2ーチエニルメチル、フルフリル等）、（vi）3ないし11個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子
10 及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含むモノーまたはジー5ないし14員（好ましくは5ないし10員）の2環または3環式の芳香族複素環ーC₁₋₆アルキル基（例えば、2ーインドールメチル、3ーインドールメチル、3ー（インドールー3ーイル）プロピル、2ーキノリルメチル、1ーイソキノリルメチル、2ーベンゾ
15 ゴ〔b〕チエニルメチル、2ーベンゾ〔b〕フラニルメチル等）などが用いられ、なかでもメチル、エチル、ベンジル、3ー（インドールー3ーイル）プロピルなどが好ましく用いられる。

（3）環基を含む置換基で置換されていてもよいC₆₋₁₄アリール基としては、例えば、（i）C₆₋₁₄炭素環基（例、シクロアルキル、フェニル、
20 1ーナフチル、2ーナフチル等）、（ii）炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし7員の単環式複素環基（例、3ーピリジル、2ーチエニル等）、（iii）3ないし11個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘ
25 テロ原子を含む5ないし14員（好ましくは5ないし10員）の2環または3環式の芳香族複素環基（例えば、2ーインドリル、3ーインドリル、2ーキノリル、1ーイソキノリル、2ーベンゾ〔b〕チエニル、2ーベンゾ〔b〕フラニル等）などで置換されていてもよいC₆₋₁₄アリール基（例、フェニル、ナフチル、ビフェニル）などが用いられる。

(4) 環基を含む置換基で置換されていてもよいカルバモイル基としては、(i) カルバモイル、(ii) モノーまたはジ- C_{1-15} アルキルカルバモイル基 (例、メチルカルバモイル、エチルカルバモイル、(iii) モノーまたはジ- C_{3-8} シクロアルキル-カルバモイル (例、シクロプロピルカルバモイル、シクロペンチルカルバモイル、シクロヘキシルカルバモイル等)、(iv) モノーまたはジ- C_{3-8} シクロアルキル- C_{1-6} アルキル-カルバモイル (例えば、シクロプロピルメチルカルバモイル、シクロペンチルメチルカルバモイル、2-シクロヘキシルエチルカルバモイル等) (v) モノーまたはジ- C_{6-14} アリール-カルバモイル (例、フェニルカルバモイル等)、モノーまたはジ- C_{6-14} アラキル-カルバモイル (例、ベンジルカルバモイル、フェネチルカルバモイル等)、(vi) 炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含むモノーまたはジ-5ないし7員の単環式複素環カルバモイル (例、3-ピリジンカルバモイル、2-チオフエンカルバモイル、ピペリジン-3-イルカルバモイル等)、(vii) 炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含むモノーまたはジ-5ないし7員の単環式複素環- C_{1-6} アルキルカルバモイル (例、3-ピリジルメチルカルバモイル、2-(ピリジン-2-イル)エチルカルバモイル、2-(ピペリジン-1-イル)エチルカルバモイル等)、(viii) 3ないし11個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含むモノーまたはジ-5ないし14員 (好ましくは5ないし10員) の2環または3環式の芳香族複素環カルバモイル (例、4-インドールカルバモイル、5-インドールカルバモイル、3-キノリルカルバモイル、5-キノリルカルバモイル等)、(ix) 3ないし11個の炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子及び酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含むモノーまたはジ-5ないし14員 (好ましくは5ないし10員) の2環または3環式の芳香族複素環- C_{1-6} アルキルカ

ルボニル（例、ベンズイミダゾール-2-イルメチルカルバモイル、2-（インドール-3-イル）エチルカルバモイル等）、（x）5ないし7員の環状カルバモイル（例、1-ピロリジニルカルボニル、1-ピペリジニルカルボニル、ヘキサメチレンイミノカルボニル等）（xi） C_{1-15} アシルカルバモイル（ここで言う C_{1-15} アシルは「環基を含む置換基で置換されていてもよい C_{1-15} アシル基」の「 C_{1-15} アシル基」と同意義を示す）、（xii） C_{1-15} アルキルアミノカルバモイル（ここで言う C_{1-15} アルキルは「環基を含む置換基で置換されていてもよい C_{1-15} アルキル基」の「 C_{1-15} アルキル基」と同意義を示す）（xiii） C_{6-14} アリールアミノカルバモイル（ここで言う C_{6-14} アリールは「環基を含む置換基で置換されていてもよい C_{6-14} アリール基」の「 C_{6-14} アリール基」と同意義を示す）などが用いられ、なかでも2-（インドール-3-イル）エチルカルバモイルなどが好ましく用いられる。

（5）環基を含む置換基で置換されていてもよいカルボキシ基としては、（i） C_{1-15} アルキルオキシカルボニル（ここで言う C_{1-15} アルキルは「環基を含む置換基で置換されていてもよい C_{1-15} アルキル基」の「 C_{1-15} アルキル基」と同意義を示す。例、tert-ブチルオキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル、9-フルオレニルメトキシカルボニル）、（ii） C_{6-14} アリールオキシカルボニル（ここで言う C_{6-14} アリールは「環基を含む置換基で置換されていてもよい C_{6-14} アリール基」の「 C_{6-14} アリール基」と同意義を示す。例、フェノキシカルボニル）、などが用いられる。

（6）環基を含む置換基で置換されていてもよいスルフィノ基としては、（i） C_{1-15} アルキルスルホニル（ここで言う C_{1-15} アルキルは「環基を含む置換基で置換されていてもよい C_{1-15} アルキル基」の「 C_{1-15} アルキル基」と同意義を示す。例、ベンジルスルホニル）、（ii） C_{6-14} アリールスルホニル（ここで言う C_{6-14} アリールは「環基を含む置換基で置換されていてもよい C_{6-14} アリール基」の「 C_{6-14}

- 「アリール基」と同意義を示す。例、トシル)などが用いられる。
- (7) 環を含む置換基基で置換されていてもよいアミノ基としては、
- (i) アミノ、(ii) C_{1-15} アルキルアミノ(ここで言う C_{1-15} アルキルは「環基を含む置換基で置換されていてもよい C_{1-15} アルキル基」の「 C_{1-15} アルキル基」と同意義を示す。例、N-メチルアミノ)、(iii) C_{1-15} アシルアミノ(ここで言う C_{1-15} アシルは「環基を含む置換基で置換されていてもよい C_{1-15} アシル基」の「 C_{1-15} アシル基」と同意義を示す。例、N-アセチルアミノ)などが用いられる。
- (8) 環基を含む置換基で置換されていてもよいグリオキシロイル基としては、(i) C_{1-15} アルキルオキザリル(ここで言う C_{1-15} アルキルは「環基を含む置換基で置換されていてもよい C_{1-15} アルキル基」の「 C_{1-15} アルキル基」と同意義を示す。例、エチルオキザリル)、(ii) C_{6-14} アリールオキザリル(ここで言う C_{6-14} アリールは「環基を含む置換基で置換されていてもよい C_{6-14} アリール基」の「 C_{6-14} アリール基」と同意義を示す。例、フェニルオキザリル)などが用いられる。

上記した中でも、 J^1 としては、水素原子、アセチル、3-インドールカルボニル、3-(インドール-3-イル)プロピオニル、3-フェニルプロピオニル、ジフェニルアセチル、3-(ピリジン-3-イル)プロピオニル、4-イミダゾールアセチル、シクロヘキサンカルボニル、1-ピペリジンアセチル、1-メチル-1-ピペリジニオアセチル、4-ピペリジンカルボニル、ヘキサノイル、アミノ-(4-ヒドロキシフェニル)アセチル、D-グルクロニル、2-(インドール-3-イル)エチルカルバモイル、tert-ブチルオキシカルボニル、9-フルオレニルメトキシカルボニル、アミノなどが好ましく用いられ、なかでも水素原子、アセチル、3-インドールカルボニル、3-(インドール-3-イル)プロピオニル、3-フェニルプロピオニル、3-(ピリジン-3-イル)プロピオニル、4-イミダゾールアセチル、シクロヘキサ

ンカルボニル、ヘキサノイル、アミノー（４－ヒドロキシフェニル）アセチル、２－（インドール－３－イル）エチルカルバモイル、９－フルオレニルメトキシカルボニル、アミジノなどが好ましい。

- J^2 は（１） C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよいNH、（２）
5 C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい CH_2 、（３）Oまたは（４）Sを示す。

「 C_{1-6} アルキル基」としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシルなどが用いられる。

- 10 J^2 としては、NHが好ましい。

$J^3 \sim J^{12}$ はそれぞれ水素原子または C_{1-3} アルキル基を示す。

「 C_{1-3} アルキル基」としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピルが用いられる。

J^3 としては、水素原子が好ましい。

- 15 J^4 としては、水素原子が好ましい。

J^5 としては、水素原子が好ましい。

J^6 としては、水素原子が好ましい。

J^7 としては、水素原子が好ましい。

J^8 としては、水素原子が好ましい。

- 20 J^9 としては、水素原子が好ましい。

J^{10} としては、水素原子が好ましい。

J^{11} としては、水素原子が好ましい。

J^{12} としては、水素原子が好ましい。

$Q^3 \sim Q^{12}$ はそれぞれ、

- 25 （１）置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基、
（２）置換されていてもよい、１ないし７個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる５ないし１４員芳香族複素環基、
（３）置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基、

- (4) 置換されていてもよい、3ないし11個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族縮合複素環基、
- (5) 置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基、
- 5 (6) 置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基、
- (7) 置換されていてもよいアミノ基、
- (8) 置換されていてもよいグアニジノ基、
- (9) 置換されていてもよいヒドロキシル基、
- (10) 置換されていてもよいカルボキシル基、
- 10 (11) 置換されていてもよいカルバモイル基、および
- (12) 置換されていてもよいスルフヒドリル基
- から成る群から選ばれる置換基を有していてもよい C_{1-4} アルキル基を示す。

特に、 $Q^3 \sim Q^6$ としては、

- 15 (1) 置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基、
- (2) 置換されていてもよい、1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族複素環基、
- (3) 置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基、
- 20 (4) 置換されていてもよい、3ないし11個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族縮合複素環基、
- (5) 置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基、
- (6) 置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基、
- 25 (7) 置換されていてもよいアミノ基、
- (8) 置換されていてもよいグアニジノ基、
- (9) 置換されていてもよいヒドロキシル基、
- (10) 置換されていてもよいカルボキシル基、
- (11) 置換されていてもよいカルバモイル基、および

(12) 置換されていてもよいスルフヒドリル基

から成る群から選ばれる置換基を有する C_{1-4} アルキル基が好ましい。

「置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基」、「置換されていてもよい 1 ないし 7 個の炭素原子と窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる 5 ないし 14 員芳香族複素環基」、「置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基」、「置換されていてもよい 3 ないし 11 個の炭素原子と窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる 5 ないし 14 員芳香族縮合複素環基」、「置換されていてもよい炭素数 7 以下の非芳香性環状炭化水素基」および「置換されていてもよい炭素数 7 以下の非芳香性複素環基」としては、前記と同様のものが用いられる。

(1) 置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基を有している C_{1-4} アルキル基としては、例えばベンジル、4-ヒドロキシベンジル、2-クロロベンジル、3-クロロベンジル、4-クロロベンジル、4-アミノベンジルなどが用いられる。

(2) 置換されていてもよい 1 ないし 7 個の炭素原子と窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる 5 ないし 14 員芳香族複素環基を有している C_{1-4} アルキル基としては、例えば、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、4-イミダゾールメチルなどが用いられる。

(3) 置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基を有している C_{1-4} アルキル基としては、例えば、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチルなどが用いられる。

(4) 置換されていてもよい 3 ないし 11 個の炭素原子と窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる 5 ないし 14 員芳香族縮合複素環基を有している C_{1-4} アルキル基としては、例えば、3-インドールメチル、1-ホルミルインドール-3-イルメチル、2-キノリルメチルなどが用いられる。

(5) 置換されていてもよい炭素数 7 以下の非芳香性環状炭化水素基を

有しているC₁₋₄アルキル基としては、例えば、シクロヘキシルメチルなどが用いられる。

(6) 置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基を有しているC₁₋₄アルキル基としては、例えば、ピペリジン-1-イルメチル
5 などが用いられる。

(7) 置換されていてもよいアミノ基を有しているC₁₋₄アルキル基としては、例えば、2-アミノエチル、3-アミノプロピル、4-アミノブチル、4-アセタミドブチルなどが用いられる。

(8) 置換されていてもよいグアニジノ基を有しているC₁₋₄アルキル
10 基としては、例えば、3-グアニジノプロピル、3-(N-トシル)グアニジノプロピルなどが用いられる。

(9) 置換されていてもよいヒドロキシル基を有しているC₁₋₄アルキル基としては、例えば、ヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチル、ベンジルオキシメチルなどが用いられる。

15 (10) 置換されていてもよいカルボキシル基を有しているC₁₋₄アルキル基としては、例えば、カルボキシルメチル、2-カルボキシルエチル、ベンジルオキシカルボニルメチルなどが用いられる。

(11) 置換されていてもよいカルバモイル基を有しているC₁₋₄アルキル基としては、例えば、カルバモイルメチル、2-カルバモイルエチル、
20 キサントイルカルバモイルなどが用いられる。

(12) 置換されてもよいスルフヒドリル基を有しているC₁₋₄アルキル基としては、例えば、スルフヒドリルメチル、2-(メチルスルフヒドリル)エチルなどが用いられる。

(13) 無置換のC₁₋₄アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、
25 プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチルなどが用いられる。

Q³としては、4-ヒドロキシベンジル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、メチル、イソブチル、ヒドロキシメチル、カルボキシメチル、4-アミノブチルなどが好ましく用いられ、特に、4-ヒドロ

キシベンジル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチルなどが好ましく用いられる。

Q⁴としては、カルバモイルメチル、2-カルバモイルエチル、4-ヒドロキシベンジル、4-イミダゾールメチル、イソブチル、ヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチル、カルボキシメチル、4-アミノブチルなどが好ましく用いられ、特に、カルバモイルメチル、2-カルバモイルエチル、4-ヒドロキシベンジルなどが好ましく用いられる。

Q⁵としては、ベンジル、2-クロロベンジル、3-クロロベンジル、4-クロロベンジル、4-アミノベンジル、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、3-インドールメチル、1-ホルミルインドール-3-イルメチル、2-キノリルメチル、シクロヘキシルメチル、ヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチル、メチル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、カルボキシメチル、4-アミノブチルなどが好ましく用いられ、特に、ベンジル、2-クロロベンジル、3-クロロベンジル、4-クロロベンジル、4-アミノベンジル、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、3-インドールメチル、2-キノリルメチル、シクロヘキシルメチル、1-ヒドロキシエチル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチルなどが好ましく用いられる。

Q⁶としては、メチル、ヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチル、カルバモイルメチル、2-カルバモイルエチルなどが好ましく用いられ、特に、カルバモイルメチルなどが好ましく用いられる。

Q⁷としては、4-ヒドロキシベンジル、カルバモイルメチル、3-ピリジルメチルなどが好ましく用いられ、特に、4-ヒドロキシベンジルなどが好ましく用いられる。

Q⁸としては、ベンジル、4-ピリジルメチル、2-ナフチルメチル、3-インドールメチル、ヒドロキシメチル、シクロヘキシルメチル、sec-ブチル、1-ヒドロキシエチルなどが好ましく用いられ、特に、4-

ーピリジルメチル、3-インドールメチル、sec-ブチルなどが好ましく用いられる。

Q⁹としては、カルバモイルメチルなどが好ましく用いられる。

Q¹⁰としては、4-ヒドロキシベンジル、3-インドールメチル、
5 メチル、1-ヒドロキシエチル、3-グアニジノプロピルなどが好ましく用いられ、特に、3-インドールメチルなどが好ましく用いられる。

Q¹¹としては、カルバモイルメチルなどが好ましく用いられる。

Q¹²としては、カルバモイルメチルなどが好ましく用いられる。

Y¹~Y³はそれぞれ式-CO-N(J¹³)-、-C(SN(J¹³))-、-C
10 (J¹⁴)-N(J¹³)-または-N(J¹³)-CO-(J¹³およびJ¹⁴はそれぞれ水素原子またはC₁₋₃アルキル基を示す)で示される基を示す。

J¹³およびJ¹⁴で示されるC₁₋₃アルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピルが用いられる。

J¹³としては、水素原子が好ましい。

15 J¹⁴としては、水素原子が好ましい。

Y¹としては、式-CONH-、または-CH₂NH-で示される基などが好ましい。

Y²としては、式-CONH-、または-CH₂NH-で示される基などが好ましい。

20 Y³としては、式-CONH-で示される基などが好ましい。

J³とQ³、J⁴とQ⁴、J⁵とQ⁵、J⁶とQ⁶、J⁷とQ⁷、J⁸とQ⁸、
、J⁹とQ⁹、J¹⁰とQ¹⁰、J¹¹とQ¹¹、J¹²とQ¹²が結合することで環を形成してもよい。この場合、C(J³)(Q³)、C(J⁴)(Q⁴)、C(J⁵)(Q⁵)、C(J⁶)(Q⁶)、C(J⁷)(Q⁷)、C
25 (J⁸)(Q⁸)、C(J⁹)(Q⁹)、C(J¹⁰)(Q¹⁰)、C(J¹¹)(Q¹¹)またはC(J¹²)(Q¹²)で、例えば、シクロペンタン、シクロヘキサン、ピペリジンなどを形成する。

J²とQ³、Y¹とQ⁴、Y²とQ⁵、Y³とQ⁶、J²とQ⁷、Y²とQ⁸、
、Y³とQ⁹、J²とQ¹⁰、Y³とQ¹¹、J²とQ¹²が結合することで環

を形成してもよい。

J^2 と Q^3 、 J^2 と Q^7 、 J^2 と Q^{10} 、 J^2 と Q^{12} が結合して環を形成する場合、 $J^2-C(J^3)(Q^3)$ 、 $J^2-C(J^7)(Q^7)$ 、 $J^2-C(J^{10})(Q^{10})$ 、 $J^2-C(J^{12})(Q^{12})$ で、例えば、ピロリジン、ピペリジン、チアゾリジンを形成する。

Y^1 と Q^4 、 Y^2 と Q^5 、 Y^3 と Q^6 、 Y^2 と Q^8 、 Y^3 と Q^9 、 Y^3 と Q^{11} が結合して環を形成する場合、 $Y^1C(J^4)(Q^4)$ 、 $Y^2C(J^5)(Q^5)$ 、 $Y^3C(J^6)(Q^6)$ 、 $Y^2C(J^8)(Q^8)$ 、 $Y^3C(J^9)(Q^9)$ 、 $Y^3C(J^{11})(Q^{11})$ で、例えば、ピロリジン-2-カルボニル、ピペリジン-2-カルボニル、チアゾリジン-4-カルボニルを形成する。

式 $J^1-J^2-C(J^3)(Q^3)-Y^1C(J^4)(Q^4)-Y^2C(J^5)(Q^5)-Y^3C(J^6)(Q^6)-C(=Z^{10})-$ で表わされる基としては、例えば、

- 15 Tyr Asn Trp Asn-,
- Tyr Asn Trp D-Asn-,
- Tyr Asn D-Trp Asn-,
- Tyr D-Asn Trp Asn-,
- D-Tyr Asn Trp Asn-,
- 20 Tyr Lys Trp Asn-,
- Tyr Asp Trp Asn-,
- Tyr Tyr Trp Asn-,
- Tyr Leu Trp Asn-,
- Tyr Asn Ala Asn-,
- 25 Tyr Asn Leu Asn-,
- Tyr Asn Ser Asn-,
- Tyr Asn Asp Asn-,
- Tyr Asn Lys Asn-,
- Ala Asn Trp Asn-,

- Leu Asn Trp Asn-,
Ser Asn Trp Asn-,
Asp Asn Trp Asn-,
Lys Asn Trp Asn-,
5 Tyr Asn Trp (For) Asn-,
D-Tyr Asn D-Trp Asn-,
D-Tyr Asn Ala Asn-,
D-Tyr Asn Ser Asn-,
D-Tyr Asn Cha Asn-,
10 D-Tyr Asn Thr Asn-,
D-Tyr Asn Ile Asn-,
D-Tyr Gln Trp Asn-,
D-Tyr Thr Trp Asn-,
D-Tyr Asn Val Asn-,
15 D-Tyr D-Asn Trp Asn-,
D-Tyr D-Asn D-Trp Asn-,
D-Tyr Asn Phe Asn-,
D-Tyr Asn Nal (1) Asn-,
D-Tyr Asn Nal (2) Asn-,
20 D-Tyr Asn Phe (2Cl) Asn-,
D-Tyr Asn Phe (3Cl) Asn-,
D-Tyr Asn Phe (4Cl) Asn-,
D-Tyr Asn Phe (4NH₂) Asn-,
D-Tyr Asn Pya (3) Asn-,
25 D-Tyr D-Asn Phe Asn-,
D-Tyr D-Asn Cha Asn-,
D-Tyr D-Asn Thr Asn-,
D-Tyr Asn Pya (2) Asn-,
D-Tyr Asn Pya (4) Asn-,

- D-Tyr D-Ser Trp Asn-,
 D-Tyr D-His Trp Asn-,
 D-Pya (3) D-Asn Cha Asn-,
 D-Pya (3) D-Tyr Cha Asn-,
 5 TyrΨ (CH₂NH) Asn Trp Asn-,
 D-Tyr AsnΨ (CH₂NH) Trp Asn-,
 TyrΨ (CH₂NH) Asn D-Trp Asn-,
 D-Tyr Asn Ala (2-Qui) Asn-,
 D-Tyr Asn D-Pya (4) Asn-,
 10 D-Tyr D-Asn Pya (4) Asn-,
 Tyr D-Asn Cha Asn-,
 D-Tyr D-Asn Thr Asn-,
 D-Tyr D-Asn Pya (4) Asn-などが好ましい。

- 式 $J^1 - J^2 - C(J^7)(Q^7)Y^2C(J^8)(Q^8)Y^3C(J^9)(Q^9)C(=Z^{10})$ - で表わされる基としては、例えば、
 15 Fmoc Asn Trp Asn-,
 D-Asn Trp Asn-,
 D-Tyr Trp Asn-,
 D-Tyr D-Trp Asn-,
 20 D-Tyr Ser Asn-,
 D-Tyr Thr Asn-,
 D-Tyr Ile Asn-,
 D-Tyr Phe Asn-,
 D-Tyr Nal (2) Asn-,
 25 D-Pya (3) Phe Asn-,
 D-Pya (3) Trp Asn-,
 D-Tyr D-Pya (4) Asn-,
 D-Asn Cha Asn-
 などが好ましい。

式 $J^1 - J^2 - C(J^{10})(Q^{10})Y^3C(J^{11})(Q^{11})C(=Z^{10})$ - で表わされる基としては、例えば、

Fmoc Trp Asn-,

Boc Tyr Asn-,

5 Tyr Asn-,

D-Trp Asn-,

Ac Trp Asn-,

Amidino Trp Asn-,

Ac Ala Asn-,

10 Ac Arg Asn-,

Ac Thr Asn-などが好ましい。

式 $J^1 - J^2 - C(J^{12})(Q^{12})C(=Z^{10})$ - で表わされる基としては、

Fmoc Asn-,

15 3-(Indol-3-yl)propionyl Asn-,

3-Indolecarbonyl Asn-,

3-Indoleacetyl Asn-,

4-(Indol-3-yl)butyryl Asn-,

Diphenylacetyl Asn-,

20 Hexanoyl Asn-,

Cyclohexanecarbonyl Asn-,

2-(Indol-3-yl)ethylcabamoyl Asn-,

3-Pyridylpropionyl Asn-,

4-Imidazoleacetyl Asn-,

25 Piperidinecarbonyl Asn-,

1-Piperidineacetyl Asn-,

1-Methyl-1-piperidinioacetyl Asn-,

1-Pyridinioacetyl Asn-,

D-Glucronyl Asn-などが好ましい。

式 J^{1-} で表わされる基としては、例えば、水素原子などが好ましい。

本発明のメタスチン誘導体（I）としては、前記した各記号の基を任意に組み合わせた全ての化合物が好ましく用いられるが、なかでも以下
5 の化合物番号で示す化合物（表1～11）が好適である。

MS10 : Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

化合物番号17 : [Pya (4) 10]MS10

Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Pya (4) -NH₂

10 化合物番号18 : [Tyr (Me) 10]MS10

Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr (Me) -NH₂

化合物番号19 : [Phe (2F) 10] MS10

Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (2F)-NH₂

化合物番号23 : [Tyr5]MS10

15 Tyr-Asn-Trp-Asn-Tyr-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

化合物番号24 : [Leu5]MS10

Tyr-Asn-Trp-Asn-Leu-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

化合物番号30 : Acetyl-MS10

Acetyl-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

20 化合物番号31 : Fmoc-MS10

Fmoc-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

化合物番号38: [D-Ser5] MS10

Tyr-Asn-Trp-Asn-D-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

化合物番号39 : [D-Asn4] MS10

25 Tyr-Asn-Trp-D-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

化合物番号40 : [D-Trp3] MS10

Tyr-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

化合物番号41: [D-Asn2] MS10

Tyr-D-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

- 化合物番号42 : [D-Tyr1] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号44 : [Lys9] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Lys-Phe-NH₂
- 5 化合物番号45 : [Ala8] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Ala-Arg-Phe-NH₂
化合物番号50 : [Ala7] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Ala-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号51 : [NMePhe10] MS10
- 10 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-NMePhe-NH₂
化合物番号53 : des (1-3) -Fmoc-MS10
Fmoc-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号54 : des (1-2) -Fmoc-MS10
Fmoc-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
- 15 化合物番号55 : des (1) -Fmoc-MS10
Fmoc-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号56 : [Lys2] MS10
Tyr-Lys-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号57 : [Asp2] MS10
- 20 Tyr-Asp-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号58 : [Tyr2] MS10
Tyr-Tyr-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号59 : [Leu2] MS10
Tyr-Leu-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
- 25 化合物番号60 : [Pya (3) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Pya (3) -NH₂
化合物番号61 : [Phe (4F) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (4F) -NH₂
化合物番号67 : [Ala3] MS10

- Tyr-Asn-Ala-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号68 : [Leu3] MS10
- Tyr-Asn-Leu-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号69 : [Ser3] MS10
- 5 Tyr-Asn-Ser-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号70 : [Asp3] MS10
- Tyr-Asn-Asp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号71 : [Lys3] MS10
- Tyr-Asn-Lys-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
10 化合物番号72 : [Ala1] MS10
- Ala-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号73 : [Leu1] MS10
- Leu-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号74 : [Ser1] MS10
- 15 Ser-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号75 : [Asp1] MS10
- Asp-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号76 : [Lys1] MS10
- Lys-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
20 化合物番号77 : [Phe (4CN) 10] MS10
- Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (4CN) -NH₂
化合物番号78 : [Trp (For) 3, Phe (4CN) 10] MS10
- Tyr-Asn-Trp (For) -Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (4CN) -NH₂
化合物番号79 : [Hph10] MS10
- 25 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Hph-NH₂
化合物番号81 : [NMeArg9] MS10
- Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-NMeArg-Phe-NH₂
化合物番号82 : [Arg (Me) 9] MS10
- Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂

- 化合物番号83 : [Arg (asy Me₂) 9] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (asyMe₂) -Phe-NH₂
化合物番号87 : des (4-5) -Boc-MS10
Boc-Tyr-Asn-Trp-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
- 5 化合物番号88 : des (4-5) -MS10
Tyr-Asn-Trp-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号90 : [9Ψ 10, CH₂NH] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-ArgΨ (CH₂NH) Phe-NH₂
化合物番号91 : [8Ψ 9, CH₂NH] MS10
- 10 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-LeuΨ (CH₂NH) Arg-Phe-NH₂
化合物番号97 : [Har9] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Har-Phe-NH₂
化合物番号98 : [Lys (Me₂) 9] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Lys (Me₂) -Phe-NH₂
- 15 化合物番号101 : [Ser7] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Ser-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号105 : [Nle8] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Nle-Arg-Phe-NH₂
化合物番号107 : [Val8] MS10
- 20 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Val-Arg-Phe-NH₂
化合物番号109 : [Tyr10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH₂
化合物番号110 : [Nal (2) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Nal (2) -NH₂
- 25 化合物番号111 : [Phe (F5) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (F5) -NH₂
化合物番号112 : [Cha10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Cha-NH₂
化合物番号 114 : des (1-3) -3- (3-Indolyl) propionyl-MS10

- 3-(3-Indolyl) propionyl-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号121 : des (1-4) - [Trp5] MS10
Trp-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号123 : [NMeLeu8] MS10
- 5 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-NMeLeu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号126 : [NMeSer5] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-NMeSer-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号127 : [D-Asn4, NMePhe6] MS10
Tyr-Asn-Trp-D-Asn-Ser-NMePhe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
- 10 化合物番号128 : [10Ψ, CSNH] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-PheΨ (CSNH) NH₂
化合物番号129 : [Arg (symMe₂) 9] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (symMe₂) -Phe-NH₂
化合物番号130 : [Phe (4Cl) 10] MS10
- 15 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (4Cl) -NH₂
化合物番号131 : [Phe (4NH₂) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (4NH₂) -NH₂
化合物番号132 : [Phe (4NO₂) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (4NO₂) -NH₂
- 20 化合物番号133 : [Nal (1) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Nal (1) -NH₂
化合物番号134 : [Trp10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Trp-NH₂
化合物番号137 : [Nle9] MS10
- 25 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Nle-Phe-NH₂
化合物番号138 : [Cit9] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Cit-Phe-NH₂
化合物番号140 : [Arg (Me) 9, NMePhe10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -NMePhe-NH₂

- 化合物番号 141 : [D-Tyr1, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 142 : [D-Tyr1, D-Trp3, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 5 化合物番号 143 : [D-Trp3, Arg (Me) 9] MS10
Tyr-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 144 : des (1-3) -Fmoc- [Arg (Me) 9] MS10
Fmoc-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 145 : des (1-2) -Fmoc- [Arg (Me) 9] MS10
10 Fmoc-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 146 : [10Ψ, CSNH, D-Tyr1] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-PheΨ (CSNH) NH₂
化合物番号 150 : [Tyr6] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
- 15 化合物番号 151 : [Nal (1) 6] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Nal (1) -Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号 152 : [Nal (2) 6] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Nal (2) -Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号 153 : [Phe (F5) 6] MS10
20 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe (F₅) -Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号 154 : [Phe (4F) 6] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe (4F) -Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号 156 : [Cha6] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Cha-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
- 25 化合物番号 163 : [6Ψ7, CH₂NH] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheΨ (CH₂NH) Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号 165 : [Dap (Gly) 9] -MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Dap (Gly) -Phe-NH₂
化合物番号 166 : [6Ψ7, CSNH] MS10

- Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe Ψ (CSNH) Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号 169 : [D-Tyr1, Ala3, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Ala-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 170 : [D-Tyr1, Ser3, Arg (Me) 9] MS10
- 5 D-Tyr-Asn-Ser-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 171 : [D-Tyr1, Cha3, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 172 : [D-Tyr1, Cha6, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Cha-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 10 化合物番号 173 : [D-Tyr1, Ala7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Ala-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 174 : [D-Tyr1, Arg (Me) 9, Trp10] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Trp-NH₂
化合物番号 176 : [AzaGly7] MS10
- 15 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg-Phe-NH₂
化合物番号 181 : [D-Tyr1, Cha3, 6, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Cha-Asn-Ser-Cha-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 182 : [D-Tyr1, Cha3, 6, Arg (Me) 9, Trp10] MS10
D-Tyr-Asn-Cha-Asn-Ser-Cha-Gly-Leu-Arg (Me) -Trp-NH₂
- 20 化合物番号 183 : [Phe (4NH₂) 9] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Phe (4NH₂) -Phe-NH₂
化合物番号 184 : [Phe (4-Guanidino) 9] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Phe (4-Guanidino) -Phe-NH₂
化合物番号 185 : [Dap (GnGly) 9] MS10
- 25 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Dap (GnGly) -Phe-NH₂
化合物番号 186 : [Trp (For) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Trp (For) -NH₂
化合物番号 187 : [Abu8] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Abu-Arg-Phe-NH₂

- 化合物番号 189 : [Ala (3-Bzt) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Ala (3-Bzt) -NH₂
化合物番号 190 : [D-Tyr1, Cha3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 5 化合物番号 191 : [D-Tyr1, Ser3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Ser-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 192 : [D-Tyr1, Arg (Et) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Et) -Phe-NH₂
化合物番号 193 : [D-Tyr1, Arg (n-Pr) 9] MS10
- 10 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (n-Pr) -Phe-NH₂
化合物番号 194 : [D-Tyr1, Arg (Ac) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Ac) -Phe-NH₂
化合物番号 197 : [Phe (3F) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (3F) -NH₂
- 15 化合物番号 198 : [Phe (3, 4F₂) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (3, 4F₂) -NH₂
化合物番号 199 : [Phe (3, 4Cl₂) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (3, 4Cl₂) -NH₂
化合物番号 200 : [Phe (3CF₃) 10] MS10
- 20 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe (3CF₃) -NH₂
化合物番号 201 : [Ala (2-Qui) 10] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Ala (2-Qui) -NH₂
化合物番号 203 : [D-Tyr1, Cha6, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Cha-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 25 化合物番号 204 : [D-Tyr1, Ala7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Ala-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 205 : [D-Tyr1, Thr3, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Thr-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 206 : [D-Tyr1, Ile3, Arg (Me) 9] MS10

- D-Tyr-Asn-Ile-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号207 : [D-Tyr1, Ser4, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Trp-Ser-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号208 : [D-Tyr1, Thr4, Arg (Me) 9] MS10
- 5 D-Tyr-Asn-Trp-Thr-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号209 : [D-Tyr1, Gln4, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Trp-Gln-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号210 : [D-Tyr1, Ala4, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Trp-Ala-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
10 化合物番号211 : [D-Tyr1, Thr5, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Thr-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号212 : [D-Tyr1, Ala5, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ala-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号213 : [D-Tyr1, Val8, Arg (Me) 9] MS10
- 15 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Val-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号214 : [D-Tyr1, Gln2, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Gln-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号215 : [D-Tyr1, Thr2, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Thr-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
20 化合物番号216 : des (1) - [D-Asn2, Arg (Me) 9] MS10
- D-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号217 : des (1) - [D-Tyr2, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号218 : [N ((CH₂)₃Gn)] Gly9] MS10
- 25 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-N ((CH₂)₃Gn) Gly-Phe-NH₂
化合物番号220 : [Arg (Et) 9] MS10
- Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Et) -Phe-NH₂
化合物番号221 : [D-Tyr1, Thr3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Thr-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂

- 化合物番号222 : des (1) - [D-Tyr2, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号223 : des (1-2) - [D-Trp3, Arg (Me) 9] MS10
D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 5 化合物番号224 : des (1) - [D-Tyr2, D-Trp3, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号225 : des (1) - [D-Asn2, D-Trp3, Arg (Me) 9] MS10
D-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号226 : des (1) - [D-Tyr2, Ser3, Arg (Me) 9] MS10
- 10 D-Tyr-Ser-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号227 : des (1) - [D-Tyr2, Thr3, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Thr-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号228 : des (1) - [D-Tyr2, Ile3, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Ile-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 15 化合物番号229 : [D-Tyr1, Val3, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Val-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号230 : [D-Tyr1, D-Asn2, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-D-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号231 : [D-Tyr1, D-Asn2, D-Trp3, Arg (Me) 9] MS10
- 20 D-Tyr-D-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号232 : [D-Tyr1, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号233 : [D-Tyr1, Ile3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Ile-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 25 化合物番号234 : [D-Tyr1, Val3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Val-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号235 : [D-Tyr1, Ala3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Ala-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号236 : [D-Tyr1, D-Trp3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10

- D-Tyr-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 237 : [D-Tyr1, D-Asn2, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-D-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 238 : [D-Tyr1, D-Asn2, D-Trp3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 5 D-Tyr-D-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 239 : des (1) - [D-Tyr2, Ser3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Ser-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 240 : des (1) - [D-Tyr2, Ile3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Ile-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
10 化合物番号 241 : des (1) - [D-Tyr2, Thr3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Thr-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 242 : des (1) - [D-Tyr2, D-Trp3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 244 : [D-Tyr1, Phe3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 15 D-Tyr-Asn-Phe-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 245 : [D-Tyr1, Nal (1) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Nal (1) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 246 : [D-Tyr1, Nal (2) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Nal (2) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
20 化合物番号 247 : [D-Tyr1, Phe (2Cl) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Phe (2Cl) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 248 : [D-Tyr1, Phe (3Cl) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Phe (3Cl) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 249 : [D-Tyr1, Phe (4Cl) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 25 D-Tyr-Asn-Phe (4Cl) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 250 : [D-Tyr1, Phe (4NH₂) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Phe (4NH₂) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 251 : [D-Tyr1, Pya (3) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Pya (3) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂

- 化合物番号 252 : [D-Tyr1, D-Ala3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-D-Ala-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 化合物番号 253 : [D-Tyr1, Pro3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Pro-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 5 化合物番号 254 : des (1) - [D-Tyr2, Phe3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Phe-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 化合物番号 255 : des (1) - [D-Tyr2, Nal (2) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Nal (2) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 化合物番号 256 : des (1) - [D-Pya (3) 2, Phe3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
10 D-Pya (3) -Phe-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 化合物番号 257 : [D-Tyr1, D-Asn2, Phe3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-D-Asn-Phe-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 化合物番号 258 : [D-Pya (3) 1, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Pya (3) -Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 15 化合物番号 259 : [D-Ala1, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Ala-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 化合物番号 260 : des (1-3) -3- (3-Indolyl) propionyl-
[AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
3- (3-Indolyl) propionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 20 化合物番号 261 : [7Ψ 8, CH₂NH] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-GlyΨ (CH₂NH) Leu-Arg-Phe-NH₂
- 化合物番号 265 : des (1-3) -Indole-3-carbonyl- [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
Indole-3-carbonyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 化合物番号 266 : des (1-3) -Indole-3-acetyl- [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
25 Indol-3-acetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 化合物番号 267 : des (1-3) -4- (3-Indolyl) butyryl-
[AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
4- (3-Indolyl) butyryl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 化合物番号 268 : des (1-3) -Diphenylacetyl- [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10

- Diphenylacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 269 : des (1-3) -3-Phenylpropionyl- [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
3-Phenylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 270 : [D-Tyr1, Phe3, Ser-Phe5, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 5 D-Tyr-Asn-Phe-Asn-Ser-Phe-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 271 : des (1-2) - [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 272 : des (1-2) -Acetyl- [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
Acetyl-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 10 化合物番号 273 : des (1-2) -Amidino- [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
Amidino-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 274 : des (1-2) -Acetyl- [Ala3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
Acetyl-Ala-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 275 : des (1-2) -Acetyl- [Arg3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 15 Acetyl-Arg-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 276 : des (1-2) -Acetyl- [Thr3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
Acetyl-Thr-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 277 : des (1-3) -n-Hexanoyl- [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
n-Hexanoyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 20 化合物番号 278 : des (1-3) -Cyclohexanecarbonyl- [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
Cyclohexanecarbonyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 279 : des (1-3) -2- (Indol-3-yl) ethylcarbamoyl- [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 25 2- (indol-3-yl) ethylcarbamoyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 281 : [D-Tyr1, Pya (2) 6, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Pya (2) -Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 282 : [D-Tyr1, Pya (4) 6, Arg (Me) 9] MS10

- D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Pya (4) -Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
 化合物番号283 : [D-Tyr1, D-Asn2, Cha3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-D-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
 化合物番号284 : [D-Tyr1, D-Asn2, Thr3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 5 D-Tyr-D-Asn-Thr-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
 化合物番号 285 : [D-Tyr1, Pya (2) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Pya (2) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
 化合物番号 286 : [D-Tyr1, Pya (4) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
 10 化合物番号 287 : [D-Tyr1, D-Ser2, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-D-Ser-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
 化合物番号 288 : [D-Tyr1, D-His2, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-D-His-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
 化合物番号 289 : des (1) - [D-Pya (3) 2, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 15 D-Pya (3) -Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
 化合物番号290 : [D-Pya (3) 1, D-Asn2, Cha3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Pya (3) -D-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
 化合物番号291 : [D-Pya (3) 1, D-Tyr2, Cha3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Pya (3) -D-Tyr-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
 20 化合物番号293 : [4Ψ 5, CH₂NH] MS10
- Tyr-Asn-Trp-AsnΨ (CH₂NH) Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
 化合物番号294 : [1Ψ 2, CH₂NH] MS10
- TyrΨ (CH₂NH) Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
 化合物番号295 : [2Ψ 3, CH₂NH] MS10
- 25 Tyr-AsnΨ (CH₂NH) Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
 化合物番号 296 : [6Ψ 7, CSNH, D-Tyr1, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheΨ (CSNH) Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
 化合物番号 297 : [D-Tyr1, Thr5, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Thr-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂

- 化合物番号 298 : [D-Tyr1, D-Asn2, Thr5, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-D-Asn-Trp-Asn-Thr-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 299 : [1Ψ 2, CH₂NH, AzaGly7, Arg (Me) 9] -MS10
TyrΨ (CH₂NH) Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 5 化合物番号 300 : [1Ψ 2, CH₂NH, D-Trp3, AzaGly7, Arg (Me) 9] -MS10
TyrΨ (CH₂NH) Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 301 : [D-Tyr1, Ala (2-Qui) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Ala (2-Qui) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 302 : [D-Tyr1, D-Pya (4) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 10 D-Tyr-Asn-D-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 303 : [D-Tyr1, D-Asn2, Pya (4) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-D-Asn-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 304 : [D-Asn2, Pya (4) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
Tyr-D-Asn-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 15 化合物番号 305 : des (1) - [D-Tyr2, D-Pya (4) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-D-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 306 : [D-Pya (4) 1, D-Asn2, Cha3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Pya (4) -D-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 307 : [7Ψ 8, CH₂NH, D-Tyr1, Arg (Me) 9] MS10
- 20 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-GlyΨ (CH₂NH) Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 308 : [6Ψ 7, CH₂NH, D-Tyr1, Arg (Me) 9] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheΨ (CH₂NH) Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 310 : [Nar9] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Nar-Phe-NH₂
- 25 化合物番号 311 : [Nar (Me) 9] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Nar (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 312 : [Har (Me) 9] MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Har (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 313 : [Dab9] MS10

- Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Dab-Phe-NH₂
化合物番号314 : [Orn9] MS10
- Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Orn-Phe-NH₂
化合物番号315 : des (1) - [D-Asn2, Cha3, AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 5 D-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号316 : [D-Tyr1, D-Asn2, Thr3, AzaGly7, Arg (Me) 9, Phe (4F) 10] MS10
D-Tyr-D-Asn-Thr-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe (4F) -NH₂
化合物番号317 : [D-Tyr1, D-Asn2, Pya (4) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9, Phe (4F) 10] MS10
- 10 D-Tyr-D-Asn-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe (4F) -NH₂
化合物番号318 : [D-Tyr1, AzaGly7, Arg (Me) 9, Phe (4F) 10] MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe (4F) -NH₂
化合物番号319 : [6Ψ7, NHCO, D-Tyr1, Arg (Me) 9] MS10
- 15 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheΨ (NHCO) Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号322 : des (1-3) -3-Pyridylpropionyl-[AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
3-Pyridylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号323 : des (1-3) -4-Imidazoleacetyl-[AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 20 4-Imidazoleacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号324 : des (1-3) -4-Piperidinecarbonyl-[AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
Piperidinecarbonyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号325 : des (1-3) -1-Piperidineacetyl-[AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
- 25 [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
Piperidineacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号326 : des (1-3) -1-Methylpiperidinio-1-acetyl-[AzaGly7, Arg (Me) 9]
MS10

- Methylpiperidino-1-acetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 327 : des (1-3) -1-Pyridinioacetyl-
[AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
1-Pyridinioacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 5 化合物番号 328 : des (1-3) -D-Glucronyl- [AzaGly7, Arg (Me) 9] MS10
D-Glucronyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 375 : 2-Aminoethyl-Gly- [D-Tyr1, Arg (Me) 9] MS10
2-Aminoethyl-Gly-D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 10 化合物番号 385 : des (1) - [D-Tyr2, D-Pya (4) 3, AzaGly7, Arg (Me) 9, Trp10] MS10
D-Tyr-D-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Trp-NH₂
化合物番号 386 : des (1-3) -3-Pyridylpropionyl-
[AzaGly7, Arg (Me) 9, Trp10] MS10
- 15 3-Pyridylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Trp-NH₂
化合物番号 387 : Dap- [D-Tyr1, Arg (Me) 9] MS10
Dap-D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 397 : Methylthiocarbamoyl-Sar- [D-Tyr1, Arg (Me) 9] MS10
Methylthiocarbamoyl-Sar-D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-
- 20 Arg (Me) -Phe-NH₂
化合物番号 400 : (S) -1- (Quinolin-8-yl-carbamoyl) -4-thiapentylcarbamoyl- [D-Tyr1, Arg (Me) 9] MS10
(S) -1- (Quinolin-8-yl-carbamoyl) -4-thiapentylcarbamoyl-D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
- 25 ただし、本発明のメタスチン誘導体 (I) は、配列番号 : 1 で表わされるアミノ酸配列の第 1 ~ 54 番目 (化合物番号 1) 、第 2 ~ 54 番目、第 3 ~ 54 番目、第 4 ~ 54 番目、第 5 ~ 54 番目、第 6 ~ 54 番目、第 7 ~ 54 番目、第 8 ~ 54 番目、第 9 ~ 54 番目、第 10 ~ 54 番目、第 11 ~ 54 番目、第 12 ~ 54 番目、第 13 ~ 54 番目、第 14

～54番目、第15～54番目、第16～54番目、第17～54番目、第18～54番目、第19～54番目、第20～54番目、第21～54番目、第22～54番目、第23～54番目、第24～54番目、第25～54番目、第26～54番目、第27～54番目、第28～54番目、第29～54番目、第30～54番目、第31～54番目、第32～54番目、第33～54番目、第34～54番目、第35～54番目、第36～54番目、第37～54番目、第38～54番目、第39～54番目、第40～54番目（化合物番号2）、第41～54番目、第42～54番目（化合物番号32）、第43～54番目、第44～54番目、第45～54番目（化合物番号3）、第46～54番目（化合物番号4）、第47～54番目、第48～54番目または第49～54番目のアミノ酸配列からなるペプチド（天然型のヒト・メタスチンまたはその部分ペプチド）を含まない。

15 図面の簡単な説明

図1は、h0T7T175発現CHO細胞を用いた化合物322、化合物305、化合物303、化合物286、化合物232、化合物141の遊走阻害活性評価を示す。横軸のFBS-はFBS無添加の場合、FBS+はFBS添加の場合、322は化合物322添加の場合、305は化合物305添加の場合、303は化合物303添加の場合、286は化合物286添加の場合、232は化合物232添加の場合、141は化合物141添加の場合、(1-54)はメタスチン(1-54)添加の場合、(45-54)はメタスチン45-54添加の場合を示す。縦軸は、FBS添加の場合の遊走活性を100%とした場合の相対活性を示す。

25 図2は、ヒト結腸癌由来細胞株SW620担癌マウスを用いた化合物322およびMetastin(1-54)の腫瘍増殖抑制活性評価を示す。値は(平均値)±(標準誤差)を示す。◇はVehicle(蒸留水)を、○は化合物322(0.1mM)を、●は化合物322(1mM)を、■はMetastin(Metastin 1-54)を添加した時の結果を示す。横軸は投与後の日数を示

す。横軸上のバーは投与期間を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3) を示す。

図 3 は、ヒト結腸癌由来細胞株 SW620 担癌マウスを用いた化合物 305 および Metastin (1-54) の腫瘍増殖抑制活性評価を示す。値は (平均値) \pm (標準誤差) を示す。◇は Vehicle (蒸留水) を、○は化合物 305 (0.1 mM) を、●は化合物 305 (1 mM) を、■は Metastin (Metastin 1-54) を添加した時の結果を示す。横軸は投与後の日数を示す。横軸上のバーは投与期間を示す。縦軸は腫瘍体積 (mm^3) を示す。

10 図 4 は、メタスチンを無麻酔下のラットに静脈投与した際の血中グルコース濃度の変動を調べた結果を示す。図中、(—○—) は生理食塩水投与群、(—▲—) はメタスチン 17 nmol/kg 投与群、(—●—) はメタスチン 80 nmol/kg 投与群および (—◆—) はメタスチン 170 nmol/kg 投与群の血中グルコース濃度を表す。値は平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SE) ($n = 5$) を示す。* は生理食塩水投与群に比べて、P 値が 0.05 以下であることを示す。** は生理食塩水投与群に比べて、P 値が 0.01 以下であることを示す。

図 5 は、メタスチンを無麻酔下のラットに静脈投与した際の血中グルカゴン濃度の変動を調べた結果を示す。図中、(—○—) は生理食塩水投与群、(—●—) はメタスチン 80 nmol/kg 投与群の血中グルカゴン濃度を表す。値は平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SE) ($n = 6 \sim 9$) を示す。* は生理食塩水投与群に比べて、P 値が 0.05 以下であることを示す。** は生理食塩水投与群に比べて、P 値が 0.01 以下であることを示す。

25 図 6 は、メタスチンを無麻酔下のラットに静脈投与した際の血中インスリン濃度の変動を調べた結果を示す。図中、(—○—) は生理食塩水投与群、(—●—) はメタスチン 80 nmol/kg 投与群の血中インスリン濃度を表す。値は平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SE) ($n = 6 \sim 9$) を示す。

図 7 は、メタスチンが無麻酔下のラットに静脈投与した際の血中コルチコステロン濃度の変動を調べた結果を示す。図中、(—○—) は生理食塩水投与群、(—●—) はメタスチン 80 nmol/kg 投与群の血中コルチコステロン濃度を表す。値は平均値±標準偏差 (mean±SE) (n = 4 ~ 5) を示す。

図 8 は、メタスチンが無麻酔下のラットに静脈投与した際の血中甲状腺ホルモン (T3) 濃度の変動を調べた結果を示す。図中、(—○—) は生理食塩水投与群、(—●—) はメタスチン 80 nmol/kg 投与群の血中甲状腺ホルモン (T3) 濃度を表す。値は平均値±標準偏差 (mean±SE) (n = 4 ~ 5) を示す。

図 9 は、メタスチンが無麻酔下のラットに静脈投与した際の血中グルコース濃度の変動を調べた結果を示す。図中、(—○—) は生理食塩水投与群、(—●—) はメタスチン 80 nmol/kg 投与群の血中グルコース濃度を表す。値は平均値±標準偏差 (mean±SE) (n = 6 ~ 9) を示す。* は生理食塩水投与群に比べて、P 値が 0.05 以下であることを示す。

図 10 は、メタスチン誘導体が無麻酔下のラットに静脈投与した際の血中グルコース濃度の変動を調べた結果を示す。図中、(—○—) は生理食塩水投与群、(—●—) は KiSS1-305 80 nmol/kg 投与群、(—▲—) は KiSS1-322 80 nmol/kg 投与群の血中グルコース濃度を表す。値は平均値±標準偏差 (mean±SE) (n = 5) を示す。* は生理食塩水投与群に比べて、P 値が 0.05 以下であることを示す。** は生理食塩水投与群に比べて、P 値が 0.01 以下であることを示す。

図 11 は、メタスチンが無麻酔下のラットに静脈投与した際の血中グルカゴン濃度の変動を調べた結果を示す。図中、(—○—) は生理食塩水投与群、(—●—) は KiSS1-305 (化合物 305) 80 nmol/kg 投与群、(—▲—) は KiSS1-322 (化合物 322) 80 nmol/kg 投与群の血中グルカゴン濃度を表す。値は平均値±標準偏差 (mean±SE) (n = 5) を示す。* は生理食塩水投与群に比べて、P 値が 0.05

以下であることを示す。

図 1 2 は、ラットの血漿中に含まれるエストラジオールの濃度を表す図である。図中、縦軸はエストラジオールの濃度を、横軸は薬剤投与群のグループをそれぞれ示す。

- 5 図 1 3 は、ラットの血漿中に含まれるプロゲステロンの濃度を表す図である。図中、縦軸はエストラジオールの濃度を、横軸は薬剤投与群のグループをそれぞれ示す。

図 1 4 は、メタスチン投与による未成熟ラット血中FSH濃度の変動を表す図である。

- 10 図 1 5 は、メタスチン投与による未成熟ラット血中LH濃度の変動を表す図である。

図 1 6 は、メタスチン投与による未成熟ラット血中プロゲステロン濃度の変動を表す図である。

- 15 図 1 7 は、メタスチン投与によるラット血中FSH濃度の変動を表す図である。

図 1 8 は、メタスチン投与によるラット血中LH濃度の変動を表す図である。

図 1 9 は、メタスチン投与によるラット血中テストステロン濃度の変動を表す図である。

- 20 図 2 0 は、試験例 1 3 で測定した各投与群におけるラット 1 個体当たりの排卵数を示す図である。図中◆は、ラット個体ごとの値を示し、は各群における平均値を示す。

- 25 図 2 1 は、試験例 1 3 で測定した各投与群における血中エストラジオール濃度を表す図である。図中▲は、ラット個体ごとの値を示し、は各群における平均値を示す。

図 2 2 は、試験例 1 3 で測定した各投与群における血中プロゲステロン濃度を表す図である。図中▲は、ラット個体ごとの値を示し、—は各群における平均値を示す。

配列表フリーテキスト

- 配列番号：15 C末端がアミド化している。
- 配列番号：16 C末端がアミド化している。
- 配列番号：17 C末端がアミド化している。
- 5 配列番号：18 C末端がアミド化している。

発明を実施するための最良の形態

本発明のメタスチン誘導体（I）は、自体公知のペプチドの合成法に従って製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離法としてはたとえば、以下の（1）～（5）に記載された方法が挙げられる

15 。

- （1）M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- （2）SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- 20 （3）泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)（1975年）
- （4）矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- （5）矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店
- また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。
- 25

保護されたアミノ酸またはペプチドの縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、トリスフオスフォニウム塩類、テトラメチルウロニウム塩類、カルボジイミド類等がよい。トリスフオスフォニウム塩類としてはベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ピロリジノ）フオスフォニウムヘキサフルオロ

5 フォスフェイト (PyBOP)、プロモトリス（ピロリジノ）フオスフォニウムヘキサフルオロフオスフェイト (PyBroP)、7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ピロリジノ）フオスフォニウムヘキサフルオロフオスフェイト (PyAOP)、テトラメチルウロニウム塩類としては2-

10 (1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3ヘキサフルオロフオスフェイト (HBTU)、2-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3ヘキサフルオロフオスフェイト (HATU)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレイト (TBTU)、2-(5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムテ

15 ラフルオロボレイト (TNTU)、0-(N-スクシミジル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレイト (TSTU)、カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCDI)、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDCI · HCl) などが挙げられる。これらによる縮合にはラセミ化抑制剤（例えば、

20 HONB, HOBT, HOAt, HOOBTなど）の添加が好ましい。縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえば無水または含水のN,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素

25 類、トリフルオロエタノール、フェノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は

ペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ～ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5から6倍過剰で用いられる。固相合成の場合にはニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールなどを用いて未反応アミノ酸をアシル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、tert-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばRとして上記した C_{1-6} アルキル基、 C_{3-8} シクロアルキル基、 C_{7-14} アラルキル基の他、アリル、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、tert-ブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級(C_{2-4})アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基などの有機酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、tert-ブチル基、トリチル基(Trt)などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzl、2,6-ジクロロベンジル、2-ニトロベンジル、Br-Z、tert-ブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル (Mtr)、DNP、Bom、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

アルギニンのグアニジノ基の保護基としてはTos、Z、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルフォニル (Mtr)、p-メトキシベンゼンスルフォニル (MBS)、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルフォニル (Pmc)、メシチレン-2-スルフォニル (Mts)、2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル (Pbf)、Boc、Z、NO₂などが挙げられる。

リジンの側鎖アミノ基の保護基としてはZ、Cl-Z、トリフルオロアセチル、Boc、Fmoc、Trt、Mtr、4,4-ジメチル-2,6-ジオキソサイクロヘキシリデンエイル (Dde) などが挙げられる。

トリプトファンのインドリル保護基としてはフォルミル (For)、Z、Boc、Mts、Mtrなどが挙げられる。

アスパラギン、グルタミンの保護基としてはTrt、キササンチル (Xan)、4,4'-ジメトキシベンズヒドリル (Mbh)、2,4,6-トリメトキシベンジル (Tmob) などが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル [アルコール (たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキスクシミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (HOAt) とのエステル] などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応する亜リン酸アミドが挙げられる。

保護基の除去 (脱離) 方法としては、たとえばPd黒あるいはPd炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、臭化トリメチルシラン (TMSBr)、トリメチルシリルトリフルオ

ロメタンスルホネート、テトラフルオロホウ酸、トリス(トリフルオロ)ホウ素、三臭化ホウ素あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に $-20^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾールのようなカチオン捕捉剤や、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオール等の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の保護基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

ペプチドのアミド体を得る方法としては、アミド体合成用樹脂を用いて固相合成するかまたはカルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のメタスチン誘導体 (I) が、コンフィギュレーション ア

イソマー（配置異性体）、ジアステレオマー、コンフォーマー等として存在する場合には、所望により、前記の分離、精製手段によりそれぞれを単離することができる。また、本発明の化合物がラセミ体である場合には、通常の光学分割手段によりS体及びR体に分離することができる

5 .

本発明のメタスチン誘導体（I）に立体異性体が存在する場合には、この異性体が単独の場合及びそれらの混合物の場合も本発明に含まれる。

また、本発明のメタスチン誘導体（I）は、水和物または非水和物であつてもよい。

本発明のメタスチン誘導体（I）は同位元素（例、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S ）等で標識されていてもよい。

本明細書におけるペプチドはペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。ペプチドのC末端は、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）、カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アルキルアミド（ $-\text{CONHR}$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であつてもよいが、特にアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）が好ましい。エステルまたはアルキルアミドのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキルなどの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などがあげられる。

本発明のメタスチン誘導体（I）の塩としては、例えば金属塩、アンモニウム塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩等が挙げられる。金属塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、

マグネシウム塩、バリウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩等が挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-ピリジンジエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン等との塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等との塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等との塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルニチン等との塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸等との塩が挙げられる。

このうち、薬学的に許容し得る塩が好ましい。例えば、化合物内に酸性官能基を有する場合にはアルカリ金属塩（例、ナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（例、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩等）等の無機塩、アンモニウム塩等が、また、化合物内に塩基性官能基を有する場合には、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等無機酸との塩、または酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸との塩が好ましい。

本発明のメタスチン誘導体（I）またはその塩（以下、本発明のメタスチン誘導体（I）と略記する）のプロドラッグは、生体内における生理条件下で酵素や胃酸等による反応により本発明のメタスチン誘導体（I）に変換するメタスチン誘導体、すなわち酵素的に酸化、還元、加水分解等を起こして本発明のメタスチン誘導体に変化するメタスチン誘導体、胃酸等により加水分解等を起こして本発明のメタスチン誘導体（I）に変化するメタスチン誘導体をいう。

本発明のメタスチン誘導体（I）のプロドラッグとしては、本発明のメタスチン誘導体（I）のアミノ基がアシル化、アルキル化、リン酸化されたメタスチン誘導体（例えば、本発明のメタスチン誘導体（I）のアミノ基がエイコサノイル化、アラニル化、ペンチルアミノカルボニル化、（5-メチル-2-オキソ-1,3-ジオキサレン-4-イル）メトキシカルボニル化、テトラヒドロフラニル化、ピロリジルメチル化、ピバロイルオキシメチル化、tert-ブチル化されたメタスチン誘導体等）；本発明のメタスチン誘導体（I）の水酸基がアシル化、アルキル化、リン酸化、ホウ酸化されたメタスチン誘導体（例えば、本発明のメタスチン誘導体（I）の水酸基がアセチル化、パルミトイル化、プロパノイル化、ピバロイル化、スクシニル化、フマリル化、アラニル化、ジメチルアミノメチルカルボニル化されたメタスチン誘導体等）；本発明のメタスチン誘導体（I）のカルボキシ基がエステル化、アミド化されたメタスチン誘導体（例えば、本発明のメタスチン誘導体（I）のカルボキシ基がエチルエステル化、フェニルエステル化、カルボキシメチルエステル化、ジメチルアミノメチルエステル化、ピバロイルオキシメチルエステル化、エトキシカルボニルオキシエチルエステル化、フタリジルエステル化、（5-メチル-2-オキソ-1,3-ジオキサレン-4-イル）メチルエステル化、シクロヘキシルオキシカルボニルエチルエステル化、メチルアミド化されたメタスチン誘導体等）；等が挙げられる。これらのメタスチン誘導体は自体公知の方法によって本発明のメタスチン誘導体（I）から製造することができる。

また、本発明のメタスチン誘導体（I）のプロドラッグは、広川書店1990年刊「医薬品の開発」第7巻分子設計163頁から198頁に記載されているような生理的条件下で本発明のメタスチン誘導体（I）に変化するものであってもよい。

本発明のメタスチン誘導体（I）またはその塩のプロドラッグ（以下、本発明の化合物と略記する場合がある）は癌転移抑制活性または癌増殖抑制活性を有するため、癌転移抑制剤または癌増殖抑制剤として、あ

らゆる癌（例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膵癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等）の予防・治療剤などの医薬として有用である。

さらに、本発明の化合物は膵臓機能調節作用を有するため、膵臓機能調節剤として、種々の膵臓疾患（例えば、急性または慢性膵炎、膵癌等）の治療・予防剤として有用である。

また、本発明の化合物は胎盤機能調節作用を有するため、胎盤機能調節剤として、例えば、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の發育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療剤などの医薬として有用である。

さらに、本発明の化合物は血糖上昇作用、膵グルカゴン分泌促進作用、尿生成促進作用を有しているので、血糖上昇剤、膵グルカゴン分泌促進剤、尿生成促進剤として、例えば、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリンノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防または治療剤などの医薬として有用である。

さらに、本発明の化合物は、性腺刺激ホルモン（例、FSH、LHなど）分泌促進作用、性ホルモン〔例、アンドロゲン（例、テストステロン、アンドロステンジオンなど）、エストロゲン（例、エストラジオール、エストロンなど）、プロゲステロンなど〕分泌促進作用、性腺機能改善作用、排卵誘発または促進作用、性成熟作用などを有しているので、例えば、性腺機能改善剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進剤または性ホルモン分泌促進剤、ホルモン依存性癌〔例、前立腺癌、乳癌など〕、不妊症〔例、月経不順、月経困難症、無月経症、体重減少性無月経症、続発性無月経症、無排卵症、卵巣機能低下症、性腺機能低下症、精子形成障害、性機能低下症（例、インポテンスなど）、性器萎縮症、精巣萎縮症、精巣機能障害、無精子症、低アンドロゲン血症など〕、子宮内膜症、子宮筋腫などの予防・治療剤として使用することが

できる。

さらに、本発明のメタスチン誘導体またはその塩あるいはそのプロドラッグは、アルツハイマー病、軽度認知障害などの予防・治療剤などとして有用である。

- 5 さらに、本発明の化合物は、天然型メタスチン、例えばメタスチン 5 4 (1-5 4) やメタスチン 1 0 (4 5-5 4) に比べて、優れた血中安定性を有している。

- 10 本発明の化合物を含有してなる医薬は、毒性が低く、医薬製剤の製造法で一般的に用いられている自体公知の手段に従って、本発明の化合物をそのままあるいは薬理学的に許容される担体と混合して、例えば、錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、散剤、顆粒剤、カプセル剤、（ソフトカプセルを含む）、液剤、注射剤、坐剤、徐放剤等の医薬製剤として、経口的または非経口的（例、局所、直腸、静脈投与等）に安全に投与することができる。

- 15 本発明の化合物の本発明製剤中の含有量は、製剤全体の約 0.01 ないし約 100 重量%である。

- 20 本発明の化合物の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、癌患者（体重 60 kg として）に対して、一日につき約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常、癌患者（体重 60 kg として）に対して、一日につき約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

25 本発明の医薬の製造に用いられてもよい薬理学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が挙げられ、例えば固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤及び崩壊剤、ある

いは液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤及び無痛化剤等が挙げられる。更に必要に応じ、通常の防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を適宜、適量用いることもできる。

- 5 賦形剤としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸等が挙げられる。

滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカ等が挙げられる。

- 10 結合剤としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、デンプン、ショ糖、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等が挙げられる。

- 15 崩壊剤としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、L-ヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。

溶剤としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油等が挙げられる。

- 20 溶解補助剤としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリシアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。

- 25 懸濁化剤としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン、等の界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピ

ルセルロース等の親水性高分子等が挙げられる。

等張化剤としては、例えばブドウ糖、D-ソルビトール、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等が挙げられる。

緩衝剤としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩等の
5 緩衝液等が挙げられる。

無痛化剤としては、例えばベンジルアルコール等が挙げられる。

防腐剤としては、例えばパラヒドロキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられる。

10 抗酸化剤としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸、 α -トコフェロール等が挙げられる。

さらに、本発明の化合物は、本発明の化合物以外の薬物と併用して使用することができる。

本発明の化合物と併用し得る薬物（以下、併用薬物と略記する場合がある）
15 としては、例えば、癌治療のための化学療法剤、ホルモン療法剤、免疫療法剤等の薬剤（以下、併用薬剤と略記する）と組み合わせて用いることができる。

該「化学療法剤」としては、例えばアルキル化剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来抗癌剤などが挙げられる。

20 「アルキル化剤」としては、例えば、ナイトロジェンマスタード、塩酸ナイトロジェンマスタード-N-オキシド、クロラムブチル、シクロフォスファミド、イホスファミド、チオテパ、カルボコン、トシル酸インプロスルファン、ブスルファン、塩酸ニムスチン、ミトブロニトール、メルファラン、ダカルバジン、ラニムスチン、リン酸エストラムスチン
25 ナトリウム、トリエチレンメラミン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ピボプロマン、エトグルシド、カルボプラチン、シスプラチン、ミボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、アルトレタミン、アンバムスチン、塩酸ジプロスピジウム、フォテムスチン、プレドニムスチン、プミテパ、リボムスチン、テモゾロミド、トレオスル

ファン、トロフォスファミド、ジノスタチンスチマラマー、カルボコン、アドゼレシン、システムスチン、ビゼレシンなどが挙げられる。

「代謝拮抗剤」としては、例えば、メルカプトプリン、6-メルカプトプリンリボシド、チオイノシン、メトトレキサート、エノシタピン、シタラビン、シタラビンオクフォスファート、塩酸アンシタピン、5-FU系薬剤（例、フルオロウラシル、テガフル、UFT、ドキシフルリジン、カルモフル、ガロシタピン、エミテフルなど）、アミノプテリン、ロイコボリンカルシウム、タブロイド、ブトシン、フォリネイトカルシウム、レボフォリネイトカルシウム、クラドリビン、エミテフル、フルダラビン、ゲムシタピン、ヒドロキシカルバミド、ペントスタチン、ピリトレキシム、イドキシウリジン、ミトグアゾン、チアゾプリン、アンバムスチンなどが挙げられる。

「抗癌性抗生物質」としては、例えば、アクチノマイシンD、アクチノマイシンC、マイトマイシンC、クロモマイシンA3、塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、塩酸ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、塩酸アクリルビシン、塩酸ピラルビシン、塩酸エピルビシン、ネオカルチノスタチン、ミスラマイシン、ザルコマイシン、カルチノフィリン、ミトタン、塩酸ゾルビシン、塩酸ミトキサントロン、塩酸イダルビシンなどが挙げられる。

「植物由来抗癌剤」としては、例えば、エトポシド、リン酸エトポシド、硫酸ビンブラスチン、硫酸ピンクリスチン、硫酸ビンデシン、テニポシド、パクリタキセル、ドセタクセル、ビンORELビンなどが挙げられる。

該「ホルモン療法剤」としては、例えば、ホスフェストロール、ジェチルスチルベストロール、クロロトリアニセリン、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、酢酸クロルマジノン、酢酸シプロテロン、ダナゾール、アリルエストレノール、ゲストリノン、メパルトリン、ラロキシフェン、オルメロキシフェン、レボルメロキシフェン、抗エストロゲン（例、クエン酸タモキシフェン、クエン酸トレミフェンな

ど)、ピル製剤、メピチオスタン、テストロラクトン、アミノグルテチイミド、LH-RHアゴニスト(例、酢酸ゴセレリン、ブセレリン、リユープロレリンなど)、ドロロキシフェン、エピチオスタノール、スルホン酸エチニルエストラジオール、アロマターゼ阻害薬(例、塩酸ファ
5 ドロゾール、アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、ボロゾール、フォルメスタンなど)、抗アンドロゲン(例、フルタミド、ビカルタミド、ニルタミドなど)、 5α -レダクターゼ阻害薬(例、フィナステリド、エプリステリドなど)、副腎皮質ホルモン系薬剤(例、デキサメタゾン、プレドニゾロン、ベタメタゾン、トリアムシノロンなど
10)、アンドロゲン合成阻害薬(例、アピラテロンなど)、レチノイドおよびレチノイドの代謝を遅らせる薬剤(例、リアロゾールなど)などが挙げられ、なかでもLH-RHアゴニスト(例、酢酸ゴセレリン、ブセレリン、リユープロレリンなど)が好ましい。

該「免疫療法剤(BRM)」としては、例えば、ピシバニール、ク
15 レスチン、シゾフィラン、レンチナン、ウベニメクス、インターフェロン、インターロイキン、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、エリスロポイエチン、リンホトキシン、BCGワクチン、コリネバクテリウムパルブム、レバミゾール、ポリサッカライドK、プロコダゾールなどが挙げられる。

20 本発明の化合物と併用薬物とを組み合わせることにより、

(1) 本発明の化合物または併用薬物を単独で投与する場合に比べて、その投与量を軽減することができる、

(2) 患者の症状(軽症、重症など)に応じて、本発明の化合物と併用する薬物を選択することができる、

25 (3) 本発明の化合物と作用機序が異なる併用薬物を選択することにより、治療期間を長く設定することができる、

(4) 本発明の化合物と作用機序が異なる併用薬物を選択することにより、治療効果の持続を図ることができる、

(5) 本発明の化合物と併用薬物とを併用することにより、相乗効果が

得られる、などの優れた効果を得ることができる。

以下、本発明の化合物（I）と併用薬物を併用して使用することを「本発明の併用剤」と称する。

- 本発明の併用剤の使用に際しては、本発明の化合物と併用薬物の投与
- 5 時期は限定されず、本発明の化合物またはその医薬組成物と併用薬物またはその医薬組成物を、投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。併用薬物の投与量は、臨床上用いられている投与量に準ずればよく、投与対象、投与ルート、疾患、組み合わせ等により適宜選択することができる。
- 10 本発明の併用剤の投与形態は、特に限定されず、投与時に、本発明の化合物と併用薬物とが組み合わせられていればよい。このような投与形態としては、例えば、（1）本発明の化合物と併用薬物とを同時に製剤化して得られる単一の製剤の投与、（2）本発明の化合物と併用薬物とを別々に製剤化して得られる2種2種の製剤の投与の製剤の同一投与経路での同時投与、（
- 15 3）本発明の化合物と併用薬物とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、（4）本発明の化合物と併用薬物とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での同時投与、（5）本発明の化合物と併用薬物とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与（例えば
- 20 、本発明の化合物；併用薬物の順序での投与、あるいは逆の順序での投与）などが挙げられる。

- 本発明の併用剤は、毒性が低く、例えば、本発明の化合物または（および）上記併用薬物を自体公知の方法に従って、薬理学的に許容される担体と混合して医薬組成物、例えば錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、散剤、顆粒剤、カプセル剤、（ソフトカプセルを含む）
- 25 、液剤、注射剤、坐剤、徐放剤等として、経口的または非経口的（例、局所、直腸、静脈投与等）に安全に投与することができる。注射剤は、静脈内、筋肉内、皮下または臓器内投与あるいは直接病巣に投与することができる。

本発明の併用剤の製造に用いられてもよい薬理学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質があげられ、例えば固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤及び崩壊剤、あるいは液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤及び無痛化剤等があげられる。更に必要に応じ、通常の防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を適宜、適量用いることもできる。

賦形剤としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸等が挙げられる。

10 滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカ等が挙げられる。

結合剤としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、デンプン、ショ糖、ゼラチン、
15 、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等が挙げられる。

崩壊剤としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、L-ヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。

20 溶剤としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油等が挙げられる。

溶解補助剤としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリス
25 アミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。

懸濁化剤としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン、等

の界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子等が挙げられる。

- 5 等張化剤としては、例えばブドウ糖、D-ソルビトール、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等が挙げられる。

緩衝剤としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩等の緩衝液等が挙げられる。

無痛化剤としては、例えばベンジルアルコール等が挙げられる。

- 10 防腐剤としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられる。

抗酸化剤としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸、 α -トコフェロール等が挙げられる。

- 15 本発明の併用剤における本発明の化合物と併用薬物との配合比は、投与対象、投与ルート、疾患等により適宜選択することができる。

例えば、本発明の併用剤における本発明の化合物の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して約0.01～10.0重量%、好ましくは約0.1～50重量%、さらに好ましくは約0.5～

- 20 20重量%程度である。

本発明の併用剤における併用薬物の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して約0.01～100重量%、好ましくは約0.1～50重量%、さらに好ましくは約0.5～20重量%程度である。

- 25 本発明の併用剤における担体等の添加剤の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して約1～99.99重量%、好ましくは約10～90重量%程度である。

また、本発明の化合物および併用薬物をそれぞれ別々に製剤化する場合も同様の含有量でよい。

これらの製剤は、製剤工程において通常一般に用いられる自体公知の方法により製造することができる。

例えば、本発明の化合物または併用薬物は、分散剤（例、ツイーン（Tween）80（アトラスパウダー社製、米国）、HCO 60（日光ケミカルズ製）、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、デキストリンなど）、安定化剤（例、アスコルビン酸、ピロ亜硫酸ナトリウム等）、界面活性剤（例、ポリソルベート80、マクロゴール等）、可溶剤（例、グリセリン、エタノール等）、緩衝剤（例、リン酸及びそのアルカリ金属塩、クエン酸及びそのアルカリ金属塩等）、等張化剤（例、塩化ナトリウム、塩化カリウム、マンニトール、ソルビトール、ブドウ糖等）、pH調節剤（例、塩酸、水酸化ナトリウム等）、保存剤（例、パラオキシ安息香酸エチル、安息香酸、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール等）、溶解剤（例、濃グリセリン、メグルミン等）、溶解補助剤（例、プロピレングリコール、白糖等）、無痛化剤（例、ブドウ糖、ベンジルアルコール等）などと共に水性注射剤に、あるいはオリーブ油、ゴマ油、綿実油、コーン油などの植物油、プロピレングリコールなどの溶解補助剤に溶解、懸濁あるいは乳化して油性注射剤に成形し、注射剤とすることができる。

経口投与用製剤とするには、自体公知の方法に従い、本発明の化合物または併用薬物を例えば、賦形剤（例、乳糖、白糖、デンプンなど）、崩壊剤（例、デンプン、炭酸カルシウムなど）、結合剤（例、デンプン、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、ポリビニールピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロースなど）または滑沢剤（例、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール 6000など）などを添加して圧縮成形し、次いで必要により、味のマスキング、腸溶性あるいは持続性の目的のため自体公知の方法でコーティングすることにより経口投与製剤とすることができる。そのコーティング剤としては、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、

ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、ツイーン 80、プルロニック F68、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシメチルセルロースアセテートサクシネート、オ
5 イドラギット（ローム社製、ドイツ、メタアクリル酸・アクリル酸共重
合）および色素（例、ベンガラ、二酸化チタン等）などが用いられる。
経口投与用製剤は速放性製剤、徐放性製剤のいずれであってもよい。

例えば、坐剤とするには、自体公知の方法に従い、本発明の化合物ま
たは併用薬物を油性または水性の固状、半固状あるいは液状の坐剤とす
10 ることができる。上記組成物に用いる油性基剤としては、例えば、高級
脂肪酸のグリセリド〔例、カカオ脂、ウイテプゾル類（ダイナマイトノ
ーベル社製、ドイツ）など〕、中級脂肪酸〔例、ミグリオール類（ダイ
ナマイトノーベル社製、ドイツ）など〕、あるいは植物油（例、ゴマ油
、大豆油、綿実油など）などが挙げられる。また、水性基剤としては、
15 例えばポリエチレングリコール類、プロピレングリコール、水性ゲル基
剤としては、例えば天然ガム類、セルロース誘導体、ビニール重合体、
アクリル酸重合体などが挙げられる。

上記徐放性製剤としては、徐放性マイクロカプセル剤などが挙げられ
る。

20 徐放型マイクロカプセルとするには、自体公知の方法を採用できるが
、例えば、下記〔2〕に示す徐放性製剤に成型して投与するのが好まし
い。

本発明の化合物は、固形製剤（例、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤
）などの経口投与用製剤に成型するか、坐剤などの直腸投与用製剤に成
25 型するのが好ましい。特に経口投与用製剤が好ましい。

併用薬物は、薬物の種類に応じて上記した剤形とすることができる。

以下に、〔1〕本発明の化合物または併用薬物の注射剤およびその調
製、〔2〕本発明の化合物または併用薬物の徐放性製剤または速放性製
剤およびその調製、〔3〕本発明の化合物または併用薬物の舌下錠、バ

ッカルまたは口腔内速崩壊剤およびその調製について具体的に示す。

〔１〕注射剤およびその調製

本発明の化合物または併用薬物を水に溶解してなる注射剤が好ましい。
該注射剤には安息香酸塩または／およびサリチル酸塩を含有させても
5 よい。

該注射剤は、本発明の化合物または併用薬物と所望により安息香酸塩
または／およびサリチル酸塩の双方を水に溶解することにより得られる
。

上記安息香酸、サリチル酸の塩としては、例えばナトリウム、カリウ
10 ムなどのアルカリ金属塩、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土
類金属塩、アンモニウム塩、メグルミン塩、その他トロメタモールなど
の有機酸塩などが挙げられる。

注射剤中の本発明の化合物または併用薬物の濃度は 0.5 ~ 50 w /
v %、好ましくは 3 ~ 20 w / v % 程度である。また安息香酸塩または
15 / およびサリチル酸塩の濃度は 0.5 ~ 50 w / v %、好ましくは 3 ~
20 w / v % が好ましい。

また、本剤には一般に注射剤に使用される添加剤、例えば安定化剤（
アスコルビン酸、ピロ亜硫酸ナトリウム等）、界面活性剤（ポリソルベ
ート 80、マクロゴール等）、可溶剤（グリセリン、エタノール等）、
20 緩衝剤（リン酸及びそのアルカリ金属塩、クエン酸及びそのアルカリ金
属塩等）、等張化剤（塩化ナトリウム、塩化カリウム等）、分散剤（ヒ
ドロキシプロピルメチルセルロース、デキストリン）、pH 調節剤（塩
酸、水酸化ナトリウム等）、保存剤（パラオキシ安息香酸エチル、安息
香酸等）、溶解剤（濃グリセリン、メグルミン等）、溶解補助剤（プロ
25 ピレングリコール、白糖等）、無痛化剤（ブドウ糖、ベンジルアルコール
等）などを適宜配合することができる。これらの添加剤は一般に注射
剤に通常用いられる割合で配合される。

注射剤は pH 調節剤の添加により 2 ~ 12 好ましくは 2.5 ~ 8.0 に
調整するのがよい。

注射剤は本発明の化合物または併用薬物と所望により安息香酸塩または／およびサリチル酸塩の双方を、また必要により上記添加剤を水に溶解することにより得られる。これらの溶解はどのような順序で行ってもよく、従来の注射剤の製法と同様に適宜行うことができる。

- 5 注射用水溶液は加温するのがよく、また通常の注射剤と同様にたとえば濾過滅菌、高圧加熱滅菌などを行うことにより注射剤として供することができる。

注射用水溶液は、例えば100℃～121℃の条件で5分～30分高圧加熱滅菌するのがよい。

- 10 さらに多回分割投与製剤として使用できるように、溶液の抗菌性を付与した製剤としてもよい。

〔2〕徐放性製剤または速放性製剤およびその調製

- 本発明の化合物または併用薬物を含んでなる核を所望により水不溶性物質や膨潤性ポリマーなどの被膜剤で被覆してなる徐放性製剤が好ましい。
15 い。例えば、1日1回投与型の経口投与用徐放性製剤が好ましい。

- 被膜剤に用いられる水不溶性物質としては、例えばエチルセルロース、ブチルセルロースなどのセルロースエーテル類、セルロースアセテート、セルロースプロピオネートなどのセルロースエステル類、ポリビニルアセテート、ポリビニルブチレートなどのポリビニルエステル類、ア
20 クリル酸／メタクリル酸共重合体、メチルメタクリレート共重合体、エトキシエチルメタクリレート／シンナモエチルメタクリレート／アミノアルキルメタクリレート共重合体、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、メタクリル酸アルキルアミド共重合体、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリメタクリレート、ポリメタクリルアミド、アミノアルキルメタク
25 リレート共重合体、ポリ（メタクリル酸アンヒドリド）、グリシジルメタクリレート共重合体、とりわけオイドラギットRS-100, RL-100, RS-30D, RL-30D, RL-PO, RS-PO（アクリル酸エチル・メタアクリル酸メチル・メタアクリル酸塩化トリメチル・アンモニウムエチル共重合体）、オイドラギットNE-30D（メタ

アクリル酸メチル・アクリル酸エチル共重合体)などのオイドラギット類(ローム・ファーマ社)などのアクリル酸系ポリマー、硬化ヒマシ油(例、ラプリーワックス(フロイント産業)など)などの硬化油、カルナバワックス、脂肪酸グリセリンエステル、パラフィンなどのワックス類、ポリグリセリン脂肪酸エステル等が挙げられる。

膨潤性ポリマーとしては、酸性の解離基を有し、pH依存性の膨潤を示すポリマーが好ましく、胃内のような酸性領域では膨潤が少なく、小腸や大腸などの中性領域で膨潤が大きくなる酸性の解離基を有するポリマーが好ましい。

このような酸性の解離基を有し pH依存性の膨潤を示すポリマーとしては、例えばカーボマー(Carbomer) 934P、940、941、974P、980、1342等、ポリカーボフィル(polycarbophil)、カルシウムポリカーボフィル(carcium polycarbophil)(前記はいずれもBFグツドリッチ社製)、ハイピスワコー103、104、105、304(いずれも和光純薬(株)製)などの架橋型ポリアクリル酸重合体が挙げられる。

徐放性製剤に用いられる被膜剤は親水性物質をさらに含んでもよい。

該親水性物質としては、例えばプルラン、デキストリン、アルギン酸アルカリ金属塩などの硫酸基を有していてもよい多糖類、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのヒドロキシアルキル基またはカルボキシアルキル基を有する多糖類、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールなどが挙げられる。

徐放性製剤の被膜剤における水不溶性物質の含有率は約30～約90%(w/w)、好ましくは約35～約80%(w/w)、さらに好ましくは約40～75%(w/w)、膨潤性ポリマーの含有率は約3～約30%(w/w)、好ましくは約3～約15%(w/w)である。被膜剤は親水性物質をさ

らに含んでいてもよく、その場合被膜剤における親水性物質の含有率は約50% (w/w) 以下、好ましくは約5～約40% (w/w)、さらに好ましくは約5～約35% (w/w) である。ここで上記% (w/w) は被膜剤液から溶媒（例、水、メタノール、エタノール等の低級アルコール等）を除いた被膜剤組成物に対する重量%を示す。

徐放性製剤は、以下に例示するように薬物を含む核を調製し、次いで得られた核を、水不溶性物質や膨潤性ポリマーなどを加熱溶解あるいは溶媒に溶解または分散させた被膜剤液で被覆することにより製造される。

10 I. 薬剤を含む核の調製。

被膜剤で被覆される薬物を含む核（以下、単に核と称することがある）の形態は特に制限されないが、好ましくは顆粒あるいは細粒などの粒子状に形成される。

核が顆粒または細粒の場合、その平均粒子径は、好ましくは約150～2,000 μm 、さらに好ましくは約500～約1,400 μm である。

核の調製は通常の製造方法で実施することができる。例えば、薬物に適当な賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定化剤等を混合し、湿式押し出し造粒法、流動層造粒法などにより調製する。

20 核の薬物含量は、約0.5～約95% (w/w)、好ましくは約5.0～約80% (w/w)、さらに好ましくは約30～約70% (w/w) である。

核に含まれる賦形剤としては、例えば白糖、乳糖、マンニトール、グルコースなどの糖類、澱粉、結晶セルロース、リン酸カルシウム、コーンスターチなどが用いられる。中でも、結晶セルロース、コーンスターチが好ましい。

25 結合剤としては、例えばポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、プルロニック F68、アラビアゴム、ゼラチン、澱粉などが用いられる。崩壊剤としては、例えばカルボキシメチルセルロースカルシウム (ECG505)、

クロスカルメロースナトリウム (Ac-Di-Sol)、架橋型ポリビニルピロリドン (クロスボピドン)、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース (L-HPC) などが用いられる。中でも、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、低置換度ヒドロキシプロピルセルロースが好ましい。
5 滑沢剤、凝集防止剤としては例えばタルク、ステアリン酸マグネシウムおよびその無機塩、また潤滑剤としてポリエチレングリコールなどが用いられる。安定化剤としては酒石酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸などの酸が用いられる。

核は上記製造法以外にも、例えば核の中心となる不活性担体粒子上に
10 水、低級アルコール (例、メタノール、エタノールなど) 等の適当な溶媒に溶解した結合剤をスプレーしながら、薬物あるいはこれと賦形剤、滑沢剤などとの混合物を少量ずつ添加して行なう転動造粒法、パンコーティング法、流動層コーティング法や熔融造粒法によっても調製することができる。不活性担体粒子としては、例えば白糖、乳糖、澱粉、結晶
15 セルロース、ワックス類で製造されたものが使用でき、その平均粒子径は約 100 μm ~ 約 1,500 μm であるものが好ましい。

核に含まれる薬物と被膜剤とを分離するために、防護剤で核の表面を被覆してもよい。防護剤としては、例えば前記親水性物質や、水不溶性物質等が用いられる。防護剤は、好ましくはポリエチレングリコールや
20 ヒドロキシアルキル基またはカルボキシアルキル基を有する多糖類、より好ましくはヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースが用いられる。該防護剤には安定化剤として酒石酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸等の酸や、タルクなどの滑沢剤を含んでいてもよい。防護剤を用いる場合、その被覆量は核に対して約
25 1 ~ 約 15 % (w/w)、好ましくは約 1 ~ 約 10 % (w/w)、さらに好ましくは約 2 ~ 約 8 % (w/w) である。

防護剤は通常のコーティング法により被覆することができ、具体的には、防護剤を例えば流動層コーティング法、パンコーティング法等により核にスプレーコーティングすることで被覆することができる。

II. 核の被膜剤による被覆

前記 I で得られた核を、前記水不溶性物質及び pH 依存性の膨潤性ポリマー、および親水性物質を加熱溶解あるいは溶媒に溶解または分散させた被膜剤液により被覆することにより徐放性製剤が製造される。

- 5 核の被膜剤液による被覆方法として、例えば噴霧コーティングする方法などが挙げられる。

被膜剤液中の水不溶性物質、膨潤性ポリマーまたは親水性物質の組成比は、被膜中の各成分の含有率がそれぞれ前記含有率となるように適宜選ばれる。

- 10 被膜剤の被覆量は、核（防護剤の被覆量を含まない）に対して約 1 ～ 約 90 % (w/w)、好ましくは約 5 ～ 約 50 % (w/w)、さらに好ましくは約 5 ～ 35 % (w/w) である。

- 被膜剤液の溶媒としては水または有機溶媒を単独であるいは両者の混液を用いることができる。混液を用いる際の水と有機溶媒との混合比（
15 水／有機溶媒：重量比）は、1 ～ 100 % の範囲で変化させることができ、好ましくは 1 ～ 約 30 % である。該有機溶媒としては、水不溶性物質を溶解するものであれば特に限定されないが、例えばメチルアルコール、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、n-ブチルアルコール等の低級アルコール、アセトンなどの低級アルカノン、アセトニトリル、
20 クロロホルム、メチレンクロライドなどが用いられる。このうち低級アルコールが好ましく、エチルアルコール、イソプロピルアルコールが特に好ましい。水及び水と有機溶媒との混液が被膜剤の溶媒として好ましく用いられる。この時、必要であれば被膜剤液中に被膜剤液安定化のために酒石酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸などの酸を
25 加えてもよい。

噴霧コーティングにより被覆する場合の操作は通常のコーティング法により実施することができ、具体的には、被膜剤液を例えば流動層コーティング法、パンコーティング法等により核にスプレーコーティングすることで実施することができる。この時必要であれば、タルク、酸化チ

タン、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、軽質無水ケイ酸などを滑沢剤として、グリセリン脂肪酸エステル、硬化ヒマシ油、クエン酸トリエチル、セチルアルコール、ステアリルアルコールなどを可塑剤として添加してもよい。

- 5 被膜剤による被膜後、必要に応じてタルクなどの帯電防止剤を混合してもよい。

速放性製剤は、液状（溶液、懸濁液、乳化物など）であっても固形状（粒子状、丸剤、錠剤など）であってもよい。経口投与剤、注射剤など非経口投与剤が用いられるが、経口投与剤が好ましい。

- 10 速放性製剤は、通常、活性成分である薬物に加えて、製剤分野で慣用される担体、添加剤や賦形剤（以下、賦形剤と略称することがある）を含んでいてもよい。用いられる製剤賦形剤は、製剤賦形剤として常用される賦形剤であれば特に限定されない。例えば経口固形製剤用の賦形剤としては、乳糖、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース（旭化成
15 （株）製、アビセルPH101など）、粉糖、グラニュー糖、マンニトール、軽質無水ケイ酸、炭酸マグネシウム、炭酸カルシウム、Ｌ－システインなどが挙げられ、好ましくはコーンスターチおよびマンニトールなどが挙げられる。これらの賦形剤は一種または二種以上を組み合わせ使用できる。賦形剤の含有量は速放性製剤全量に対して、例えば約4
20 . 5～約99.4 w/w%、好ましくは約20～約98.5 w/w%、さらに好ましくは約30～約97 w/w%である。

速放性製剤における薬物の含量は、速放性製剤全量に対して、約0.5～約95%、好ましくは約1～約60%の範囲から適宜選択することができる。

- 25 速放性製剤が経口固型製剤の場合、通常上記成分に加えて、崩壊剤を含有する。このような崩壊剤としては、例えばカルボキシメチルセルロースカルシウム（五徳薬品製、ECG-505）、クロスカルメロースナトリウム（例えば、旭化成（株）製、アクジゾル）、クロスボビドン（例えば、BASF社製、コリドンCL）、低置換度ヒドロキシプロピ

ルセルロース（信越化学（株））、カルボキシメチルスターチ（松谷化学（株））、カルボキシメチルスターチナトリウム（木村産業製、エキスパロタブ）、部分 α 化デンプン（旭化成（株）製、PCS）などが用いられ、例えば水と接触して吸水、膨潤、あるいは核を構成している有効成分と賦形剤との間にチャンネルを作るなどにより顆粒を崩壊させるものを用いることができる。これらの崩壊剤は、一種または二種以上を組み合わせ使用できる。崩壊剤の配合量は、用いる薬物の種類や配合量、放出性の製剤設計などにより適宜選択されるが、速放性製剤全量に対して、例えば約0.05～約30w/w%、好ましくは約0.5～約15w/w%である。

速放性製剤が経口固型製剤である場合、経口固型製剤の場合には上記の組成に加えて、所望により固型製剤において慣用の添加剤をさらに含んでいてもよい。このような添加剤としては、例えば結合剤（例えば、ショ糖、ゼラチン、アラビアゴム末、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、プルラン、デキストリンなど）、滑沢剤（例えば、ポリエチレングリコール、ステアリン酸マグネシウム、タルク、軽質無水ケイ酸（例えば、アエロジル（日本アエロジル））、界面活性剤（例えば、アルキル硫酸ナトリウムなどのアニオン系界面活性剤、ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体等の非イオン系界面活性剤など）、着色剤（例えば、タール系色素、カラメル、ベンガラ、酸化チタン、リボフラビン類）、必要ならば、橋味剤（例えば、甘味剤、香料など）、吸着剤、防腐剤、湿潤剤、帯電防止剤などが用いられる。また、安定化剤として酒石酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸などの有機酸を加えてもよい。

上記結合剤としては、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリエチレングリコールおよびポリビニルピロリドンなどが好ましく用いられる。

速放性製剤は、通常の製剤の製造技術に基づき、前記各成分を混合し

、必要により、さらに練合し、成型することにより調製することができる。上記混合は、一般に用いられる方法、例えば、混合、練合などにより行われる。具体的には、例えば速放性製剤を粒子状に形成する場合、前記徐放性製剤の核の調製法と同様の手法により、パーティクルグラニュ
5 レーター、万能練合機（畑鉄工所製）、流動層造粒機FD-5S（パウ
レック社製）等を用いて混合しその後、湿式押し出し造粒法、流動層造
粒法などにより造粒することにより調製することができる。

このようにして得られた速放性製剤と徐放性製剤とは、そのままある
いは適宜、製剤賦形剤等と共に常法により別々に製剤化後、同時あるい
10 は任意の投与間隔を挟んで組み合わせて投与する製剤としてもよく、ま
た両者をそのままあるいは適宜、製剤賦形剤等と共に一つの経口投与製
剤（例、顆粒剤、細粒剤、錠剤、カプセル等）に製剤化してもよい。両
製剤を顆粒あるいは細粒に製して、同一のカプセル等に充填して経口投
与用製剤としてもよい。

15 〔3〕舌下錠、バツカルまたは口腔内速崩壊剤およびその調製

舌下錠、バツカル製剤、口腔内速崩壊剤は錠剤などの固形製剤であっ
てもよいし、口腔粘膜貼付錠（フィルム）であってもよい。

舌下錠、バツカルまたは口腔内速崩壊剤としては、本発明の化合物ま
たは併用薬物と賦形剤とを含有する製剤が好ましい。また、滑沢剤、等
20 張化剤、親水性担体、水分散性ポリマー、安定化剤などの補助剤を含有
していてもよい。また、吸収を容易にし、生体内利用率を高めるために
 β -シクロデキストリンまたは β -シクロデキストリン誘導体（例、ヒ
ドロキシプロピル- β -シクロデキストリンなど）などを含有していても
よい。

25 上記賦形剤としては、乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結
晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤としてはステ
アリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリ
カなどが挙げられ、特に、ステアリン酸マグネシウムやコロイドシリ
カが好ましい。等張化剤としては塩化ナトリウム、グルコース、フルク

トース、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、サッカロース、グリセリン、尿素などが挙げられ、特にマンニトールが好ましい。親水性担体としては結晶セルロース、エチルセルロース、架橋性ポリビニルピロリドン、軽質無水珪酸、珪酸、リン酸ニカルシウム、炭酸カルシウムなどの膨潤性親水性担体が挙げられ、特に結晶セルロース（例、微結晶セルロースなど）が好ましい。水分散性ポリマーとしてはガム（例、トラガカントガム、アカシアガム、グアーガム）、アルギン酸塩（例、アルギン酸ナトリウム）、セルロース誘導体（例、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、ゼラチン、水溶性デンプン、ポリアクリル酸（例、カーボマー）、ポリメタクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリカーボフィル、アスコルビン酸パルミチン酸塩などが挙げられ、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリアクリル酸、アルギン酸塩、ゼラチン、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコールなどが好ましい。特にヒドロキシプロピルメチルセルロースが好ましい。安定化剤としては、システイン、チオソルビトール、酒石酸、クエン酸、炭酸ナトリウム、アスコルビン酸、グリシン、亜硫酸ナトリウムなどが挙げられ、特に、クエン酸やアスコルビン酸が好ましい。

舌下錠、パッカルまたは口腔内速崩壊剤は、本発明の化合物または併用薬物と賦形剤とを自体公知の方法により混合することにより製造することができる。さらに、所望により上記した滑沢剤、等張化剤、親水性担体、水分散性ポリマー、安定化剤、着色剤、甘味剤、防腐剤などの補助剤を混合してもよい。上記成分を同時に若しくは時間差をおいて混合した後、加圧打錠成形することにより舌下錠、パッカル錠または口腔内速崩壊錠が得られる。適度な硬度を得るため、打錠成形の過程の前後において必要に応じ水やアルコールなどの溶媒を用いて加湿・湿潤させ、成形後、乾燥させて製造してもよい。

粘膜貼付錠（フィルム）に成型する場合は、本発明の化合物または併用薬物および上記した水分散性ポリマー（好ましくは、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、賦形剤などを水などの溶媒に溶解させ、得られる溶液を流延させて (cast) フィルムとする。さらに、可塑剤、安定剤、酸化防止剤、保存剤、着色剤、緩衝剤、甘味剤などの添加物を加えてもよい。フィルムに適度の弾性を与えるためポリエチレングリコールやプロピレングリコールなどのグリコール類を含有させたり、口腔の粘膜ライニングへのフィルムの接着を高めるため生物接着性ポリマー（例、ポリカルボフィル、カルボポール）を含有させてもよい。流延は、非接着性表面に溶液を注ぎ、ドクターブレードなどの塗布用具で均一な厚さ（好ましくは10～1000ミクロン程度）にそれを広げ、次いで溶液を乾燥してフィルムを形成することにより達成される。このように形成されたフィルムは室温若しくは加温下乾燥させ、所望の表面積に切断すればよい。

好ましい口腔内速崩壊剤としては、本発明の化合物または併用薬物と、本発明の化合物または併用薬物とは不活性である水溶性若しくは水拡散性キャリアーとの網状体からなる固体状の急速拡散投与剤が挙げられる。該網状体は、本発明の化合物または併用薬物を適当な溶媒に溶解した溶液とから構成されている固体状の該組成物から溶媒を昇華することによって得られる。

該口腔内速崩壊剤の組成物中には、本発明の化合物または併用薬物に加えて、マトリックス形成剤と二次成分とを含んでいるのが好ましい。

該マトリックス形成剤としてはゼラチン類、デキストリン類ならびに大豆、小麦ならびにオオバコ (psyllium) 種子タンパクなどの動物性タンパク類若しくは植物性タンパク類；アラビアゴム、ガーガム、寒天ならびにキサンタンなどのゴム質物質；多糖類；アルギン酸類；カルボキシメチルセルロース類；カラゲナン類；デキストラン類；ペクチン類；ポリビニルピロリドンなどの合成ポリマー類；ゼラチン－アラビアゴムコンプレックスなどから誘導される物質が含まれる。さらに、マンニトール

ル、デキストロース、ラクトース、ガラクトースならびにトレハロースなどの糖類；シクロデキストリンなどの環状糖類；リン酸ナトリウム、塩化ナトリウムならびにケイ酸アルミニウムなどの無機塩類；グリシン、
5 L-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-ヒドロキシプロリン、L-イソロイシン、L-ロイシンならびにL-フェニルアラニンなどの炭素原子数が2から12までのアミノ酸などが含まれる。

マトリックス形成剤は、その1種若しくはそれ以上を、固形成の前に、溶液または懸濁液中に導入することができる。かかるマトリックス形成剤は、界面活性剤に加えて存在していてもよく、また界面活性剤が排除されて存在していてもよい。マトリックス形成剤はそのマトリックスを形成することに加えて、本発明の化合物または併用薬物の拡散状態をその溶液または懸濁液中に維持する助けをすることができる。

保存剤、酸化防止剤、界面活性剤、増粘剤、着色剤、pH調整剤、香料、甘味料若しくは食味マスキング剤などの二次成分を組成物中に含有してよい。適当な着色剤としては、赤色、黒色ならびに黄色酸化鉄類およびエリス・アンド・エベラール社のFD&Cブルー2号ならびにFD&Cレッド40号などのFD&C染料が挙げられる。適当な香料には、ミント、ラズベリー、甘草、オレンジ、レモン、グレープフルーツ、カラメル、バニラ、チェリーならびにグレープフレーバーおよびその組合せたものが含まれる。適当なpH調整剤は、クエン酸、酒石酸、リン酸、塩酸およびマレイン酸が含まれる。適当な甘味料としてはアスパルテーム、アセスルフェームKならびにタウマチンなどが含まれる。適当な食味マスキング剤としては、重炭酸ナトリウム、イオン交換樹脂、シクロデキストリン包接化合物、吸着質物質ならびにマイクロカプセル化アポモルフィンが含まれる。

製剤には通常約0.1～約50重量%、好ましくは約0.1～約30重量%の本発明の化合物または併用薬物を含み、約1分～約60分の間、好ましくは約1分～約15分の間、より好ましくは約2分～約5分の

間に（水に）本発明の化合物または併用薬物の90%以上を溶解させることが可能な製剤（上記、舌下錠、バツカルなど）や、口腔内に入れて1～60秒以内に、好ましくは1～30秒以内に、さらに好ましくは1～10秒以内に崩壊する口腔内速崩壊剤が好ましい。

- 5 上記賦形剤の製剤全体に対する含有量は、約10～約99重量%、好ましくは約30～約90重量%である。 β -シクロデキストリンまたは β -シクロデキストリン誘導体の製剤全体に対する含有量は0～約30重量%である。滑沢剤の製剤全体に対する含有量は、約0.01～約10重量%、好ましくは約1～約5重量%である。等張化剤の製剤全体に対する含有量は、約0.1～約90重量%、好ましくは、約10～約70重量%である。親水性担体の製剤全体に対する含有量は約0.1～約50重量%、好ましくは約10～約30重量%である。水分散性ポリマーの製剤全体に対する含有量は、約0.1～約30重量%、好ましくは約10～約25重量%である。安定化剤の製剤全体に対する含有量は約0.1～約10重量%、好ましくは約1～約5重量%である。上記製剤はさらに、着色剤、甘味剤、防腐剤などの添加剤を必要に応じ含有していてもよい。
- 10
- 15

本発明の併用剤の投与量は、本発明の化合物の種類、年齢、体重、症状、剤形、投与方法、投与期間などにより異なる。

- 20 本発明の化合物の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、癌患者（体重60kgとして）に対して、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常、癌患者（体重60kgとして）に対して、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。も
- 25

ちろん、前記したように投与量は種々の条件で変動するので、前記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また範囲を超えて投与する必要のある場合もある。

併用薬物は、副作用が問題とならない範囲でどのような量を設定することも可能である。併用薬物としての一日投与量は、症状の程度、投与対象の年齢、性別、体重、感受性差、投与の時期、間隔、医薬製剤の性質、調剤、種類、有効成分の種類などによって異なり、特に限定されないが、薬物の量として通常、たとえば経口投与で哺乳動物 1 kg 体重あたり約 0.001 ~ 2000 mg、好ましくは約 0.01 ~ 500 mg、
10 さらに好ましくは、約 0.1 ~ 100 mg 程度であり、これを通常 1 日 1 ~ 4 回に分けて投与する。

本発明の医薬を投与するに際しては、同時期に投与してもよいが、併用薬物を先に投与した後、本発明の化合物を投与してもよいし、本発明の化合物を先に投与し、その後で併用薬物を投与してもよい。時間差を
15 おいて投与する場合、時間差は投与する有効成分、剤形、投与方法により異なるが、例えば、併用薬物を先に投与する場合、併用薬物を投与した後 1 分 ~ 3 日以内、好ましくは 10 分 ~ 1 日以内、より好ましくは 15 分 ~ 1 時間以内に本発明の化合物を投与する方法が挙げられる。本発明の化合物を先に投与する場合、本発明の化合物を投与した後、1 分 ~
20 1 日以内、好ましくは 10 分 ~ 6 時間以内、より好ましくは 15 分から 1 時間以内に併用薬物を投与する方法が挙げられる。

好ましい投与方法としては、例えば、経口投与製剤に製形された併用薬物約 0.001 ~ 200 mg / kg を経口投与し、約 15 分後に非経口投与製剤に製形された本発明の化合物 約 0.005 ~ 0.5 mg / kg
25 g を 1 日量として非経口投与する。

メタスチンとしては、例えば WO 00 / 24890 号に記載のヒトメタスチン、WO 01 / 75104 号に記載のマウスまたはラットメタスチンなどが用いられる。

ヒトメタスチンとしては、具体的には、配列番号：1 で表されるアミ

ノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドなどがあげられる。

「配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチド」としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、かつ8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドであればいかなるものであってもよいが、生理活性（例えば、受容体結合活性、シグナル情報伝達作用、血糖上昇作用、膵グルカゴン分泌促進作用、尿生成促進作用など）が実質的に同じであることを意味する。具体的には、（i）配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表されるペプチド、（ii）配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列をC末端に有し、8乃至15個のアミノ酸残基からなるペプチドなどが用いられる。

より具体的には、ヒトメタスチンとしては、（i）配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（ヒトメタスチン54（1-54））、（ii）配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第40～54番目のアミノ酸配列からなるペプチド（ヒトメタスチン15（40-54）；配列番号：15）、（iii）配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第45～54番目のアミノ酸配列からなるペプチド（ヒトメタスチン10（45-54）；配列番号：16）、（iv）配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第46～54番目のアミノ酸配列からなるペプチド（ヒトメタスチン9（46-54）；配列番号：17）、（v）配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目のアミノ酸配列からなるペプチド（ヒトメタスチン8（47-54）；配列番号：18）などが用いられる。

マウスメタスチン（A）としては、例えば、（i）配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から第134～141番目のアミノ酸配列を含有し、8ないし52個のアミノ酸残基からなるペプチドなどが用い

られ、具体的には、(i) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列のN末端から第90～141番目のアミノ酸配列からなるペプチド、(ii) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列のN末端から第132～141番目のアミノ酸配列からなるペプチド、(iii) 配列番号：3 で表されるアミノ酸配列のN末端から第127～141番目のアミノ酸配列からなるペプチドなどが用いられる。

マウスメタスチン(B)としては、例えば、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列のN末端から第138～145番目のアミノ酸配列を含有し、8ないし52個のアミノ酸残基からなるペプチドなどが用いられ、具体的には、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列のN末端から第94～145番目のアミノ酸配列からなるペプチドなどが用いられる。

ラットメタスチンとしては、例えば、配列番号：7 で表されるアミノ酸配列のN末端から第112～119番目のアミノ酸配列を含有し、8ないし52個のアミノ酸残基からなるペプチドなどが用いられ、具体的には、(i) 配列番号：7 で表されるアミノ酸配列のN末端から第68～119番目のアミノ酸配列からなるペプチド、(ii) 配列番号：7 で表されるアミノ酸配列のN末端から第110～119番目のアミノ酸配列からなるペプチド、(iii) 配列番号：7 で表されるアミノ酸配列のN末端から第105～119番目のアミノ酸配列からなるペプチドなどが用いられる。

本明細書におけるメタスチンはペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号：1 で表されるペプチドのC末端は、カルボキシル基($-\text{COOH}$)、カルボキシレート($-\text{COO}^-$)、アミド($-\text{CONH}_2$)またはエステル($-\text{COOR}$)の何れであってもよい。エステルまたはアルキルアミドのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルな

どのフェニル-C₁₋₂アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキルなどのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などがあげられる。

- 5 さらに、メタスチンには、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、-COOH、アミノ
- 10 基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

- 本発明のメタスチンの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、
- 15 とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香
- 20 酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

- メタスチンをコードするDNAとしては、例えばWO 00/24890号に記載のヒトメタスチンをコードするDNA、WO 01/75104号に記載のマウスまたはラットメタスチンをコードするDNAなどが
- 25 用いられる。

メタスチンをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コ

スミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より totalRNA または mRNA 画分を調製したものを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する) によって増幅することもできる。

- 5 ヒトメタスチン、マウスメタスチン前駆体 (A)、マウスメタスチン前駆体 (B) またはラットメタスチン前駆体をコードする DNA としては、それぞれ配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6 または配列番号：8 で表わされる塩基配列を含有する DNA、または配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6 または配列番号：8 で表わされる塩基配列
10 とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、前記したヒトメタスチン、マウスメタスチン (A)、マウスメタスチン (B) またはラットメタスチンをコードする DNA を含有する DNA であれば何れのものでもよい。

- 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6 または配列番号：8 で表
15 わされる塩基配列とハイブリダイズできる DNA としては、例えば、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6 または配列番号：8 で表わされる塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

- 20 塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズム NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値 = 10 ; ギャップを許す ; フィルタリング = ON ; マッチスコア = 1 ; ミスマッチスコア = -3) にて計算することができる。
25

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリー

を使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 1
5 9 ~ 4 0 m M、好ましくは約 1 9 ~ 2 0 m M で、温度が約 5 0 ~ 7 0 °C、好ましくは約 6 0 ~ 6 5 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 1 9 m M で温度が約 6 5 °C の場合が最も好ましい。

具体的には、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列からなるヒトメ
タスチンをコードする DNA としては、配列番号：2 で表わされる塩基
10 配列からなる DNA が用いられる。したがって、前述した各種アミノ酸
配列からなるヒトメタスチンをコードする塩基配列としては、配列番号
：1 のアミノ酸配列中の部分アミノ酸配列に対応する塩基配列を配列番
号：2 で表わされる塩基配列から選択すればよい。

配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を含有するマウスメタスチン
15 前駆体（A）をコードする DNA としては、配列番号：4 で表わされる
塩基配列からなる DNA が用いられる。したがって、前述した各種アミ
ノ酸配列からなるマウスメタスチン（A）をコードする塩基配列として
は、配列番号：3 のアミノ酸配列中の部分アミノ酸配列に対応する塩基
配列を配列番号：4 で表わされる塩基配列から選択すればよい。

20 配列番号：5 で表わされるアミノ酸配列からなるマウスメタスチン前
駆体（B）をコードする DNA としては、配列番号：6 で表わされる塩
基配列からなる DNA が用いられる。したがって、前述した各種アミ
ノ酸配列からなるマウスメタスチン（B）をコードする塩基配列として
は、配列番号：5 のアミノ酸配列中の部分アミノ酸配列に対応する塩基配
25 列を配列番号：6 で表わされる塩基配列から選択すればよい。

配列番号：7 で表わされるアミノ酸配列からなるラットメタスチン前
駆体をコードする DNA としては、配列番号：8 で表わされる塩基配列
からなる DNA が用いられる。したがって、前述した各種アミノ酸配列
からなるラットメタスチンをコードする塩基配列としては、配列番号：

7のアミノ酸配列中の部分アミノ酸配列に対応する塩基配列を配列番号：8で表わされる塩基配列から選択すればよい。

より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（ヒトメタスチン54（1-54））をコードするDNAとしては、
5、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第40～54番目のアミノ酸配列からなるペプチド（ヒトメタスチン15（40-54）；配列番号：15）をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：
10 19で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第45～54番目のアミノ酸配列からなるペプチド（ヒトメタスチン10（45-54）；配列番号：16）をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：
20 20で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

15 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第46～54番目のアミノ酸配列からなるペプチド（ヒトメタスチン9（46-54）；配列番号：17）をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：21で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目のアミノ酸配列からなるペプチド（ヒトメタスチン8（47-54）；配列番号：18）をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：22で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

メタスチン受容体、その部分ペプチドまたはその塩としては、例えばWO 00/24890号に記載のヒトメタスチン受容体、その部分ペプチドまたはその塩、WO 01/75104号に記載のマウスまたはラットメタスチン受容体、その部分ペプチドまたはその塩などが用いられる。
25

具体的には、メタスチン受容体としては、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実

質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質などが用いられる。

配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列
5 と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；マトリクス=BLOSUM62；フィルタリング=OFF）にて計算することができる。

配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、
15 例えば、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

20 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが
25 好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なっているもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、WO00/24890号やWO01/75104号に記載のリガンドの決定方法やスクリ

ーニング方法に従って測定することができる。

また、メタスチン受容体としては、(i) 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(iv) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書におけるメタスチン受容体は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列を含有するメタスチン受容体をはじめとするメタスチン受容体のC末端は、カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルもしくは n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アララルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

メタスチン受容体がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシ

レート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、メタスチン受容体には、上記した蛋白質において、N末端の
5 メチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-SH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、
10 グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

メタスチン受容体の具体例としては、例えば、配列番号:9で表わさ
15 れるアミノ酸配列からなるヒトメタスチン受容体、配列番号:11で表わされるアミノ酸配列からなるラットメタスチン受容体、配列番号:13で表わされるアミノ酸配列からなるマウスメタスチン受容体などが用いられる。

メタスチン受容体の部分ペプチド(以下、部分ペプチドと略記する場合がある)としては、前記したメタスチン受容体の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、メタスチン受容体のタンパク質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、リガンド結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号:9、配列番号:11または配列番号:13で
25 表わされるアミノ酸配列からなるメタスチン受容体の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性(Hydrophilic)部位)であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性(Hydrophobic)部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメイ

ンを同時に含む部分のペプチドでも良い。

部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記したメタスチン受容体の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。
5 い。

また、部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに
10 好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換
されていてもよい。

また、部分ペプチドは前記したメタスチン受容体のごとく、C末端が
15 カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

さらに、部分ペプチドには、前記したメタスチン受容体と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端
20 側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

メタスチン受容体またはその部分ペプチドの塩としては、生理学的に
25 許容される塩基もしくは酸との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベン

ゼンシルホン酸)との塩などが用いられる。

メタスチン受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えばWO 00/24890号に記載のヒトメタスチン受容体またはその部分ペプチドをコードするDNA、WO 01/75104号に記載のマウスまたはラットメタスチン受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAなどが用いられる。

メタスチン受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、ヒトメタスチン受容体、マウスメタスチン受容体またはラットメタスチン受容体をコードするDNAとしては、それぞれ配列番号: 10、配列番号: 12または配列番号: 14で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 10、配列番号: 12または配列番号: 14で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号: 10、配列番号: 12または配列番号: 14で表わされるアミノ酸配列からなるヒトメタスチン受容体、マウスメタスチン受容体またはラットメタスチン受容体と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有する受容体をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号: 10、配列番号: 12または配列番号: 14で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、10、配列番号: 12または配列番号: 14で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好まし

くは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズム NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値 = 10; ギャップを許す; フィルタリング = ON; マッチスコア = 1; ミスマッチスコア = -3) にて計算することができる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 °C の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号 : 9 で表わされるアミノ酸配列からなるヒトメタスチン受容体をコードする DNA としては、配列番号 : 10 で表わされる塩基配列からなる DNA が用いられる。

配列番号 : 11 で表わされるアミノ酸配列を含有するラットメタスチン受容体をコードする DNA としては、配列番号 : 12 で表わされる塩基配列からなる DNA が用いられる。

配列番号 : 13 で表わされるアミノ酸配列からなるマウスメタスチン受容体をコードする DNA としては、配列番号 : 14 で表わされる塩基配列からなる DNA が用いられる。

メタスチン受容体、その部分ペプチドまたはその塩、およびメタスチ

ン受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAは、WO 00 / 24890号またはWO 01 / 75104号に記載されている方法で取得・製造することができる。

5 ヒトメタスチンまたはその塩、またはヒトメタスチン受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、WO 00 / 24890号に記載のものを使用することができる。

マウスまたはラットメタスチンまたはその塩、またはマウスまたはラットメタスチン受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、WO 01 / 75104号に記載のものを使用することができる。

10 メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAに対するアンチセンス・ポリヌクレオリドは、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有するポリヌクレオチドであり、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

メタスチン遺伝子またはメタスチン受容体遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたメタスチンをコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、メタスチン遺伝子またはメタスチン受容体遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいはメタスチン関連RNAまたはメタスチン受容体関連RNAとの相互作用を介してメタスチン遺伝子またはメタスチン受容体遺伝子の発現を調節・制御することができる。

25 メタスチン関連RNAまたはメタスチン受容体関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびメタスチン関連RNAまたはメタスチン受容体関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外でメタスチン遺伝子またはメタスチン受容体遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、ま

た病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。

メタスチン遺伝子またはメタスチン受容体遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、メタスチン遺伝子内またはメタスチン受容体遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、対象物と「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結

- 合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーラーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。
- 修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。
- アンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

- 5 アンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリ
- 10 カチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'
- 15 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコー
- 20 ル、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

- アンチセンス核酸の阻害活性は、前記したメタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換され
- 25 た形質転換体、メタスチンまたはメタスチン受容体の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはメタスチンまたはメタスチン受容体の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

以下に、メタスチンまたはその塩（以下、メタスチンと略記する）、

メタスチンをコードするDNA、メタスチンに対する抗体、メタスチンをコードするDNAに対するアンチDNA、メタスチン受容体、その部分ペプチドまたはその塩（以下、メタスチン受容体と略記する）、メタスチン受容体をコードするDNA、メタスチン受容体に対する抗体、メタスチン受容体をコードするDNAに対するアンチDNAなどの用途について、具体的に説明する。

（１）メタスチン、メタスチンをコードするDNA、メタスチン受容体またはメタスチン受容体をコードするDNAを含有する医薬

10 メタスチンは、血糖上昇作用、膵グルカゴン分泌促進作用、尿生成促進作用を有しているので、メタスチン、メタスチンをコードするDNA、メタスチン受容体またはメタスチン受容体をコードするDNAは、例えば、血糖上昇剤、膵グルカゴン分泌促進剤、尿生成促進剤として有用である。

15 さらには、メタスチン、メタスチンをコードするDNA、メタスチン受容体またはメタスチン受容体をコードするDNAは、例えば、肥満、高脂血症、２型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血
20 栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤として有用である。

メタスチン、メタスチンをコードするDNA、メタスチン受容体またはメタスチン受容体をコードするDNAを上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカ
25 プセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和する

ことによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

メタスチンをコードするDNAまたはメタスチン受容体をコードするDNAは、（イ）メタスチンをコードするDNAまたはメタスチン受容体をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）細胞などにメタスチンをコードするDNAまたはメタスチン受容体をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、該患者の細胞におけるメタスチンまたはメタスチン受容体の量を増加させ、メタスチンの作用を十分に発揮させることができる。

メタスチンをコードするDNAまたはメタスチン受容体をコードするDNAを用いる場合は、該DNAを単独またはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばア

アルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

メタスチン、メタスチンをコードするDNA、メタスチン受容体またはメタスチン受容体をコードするDNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人の肥満患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の肥満患者（体重 60 kg として）への投与においては、一日につき約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。

他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

（２）メタスチンまたはメタスチン受容体に対する抗体を含有する医薬
メタスチンまたはメタスチン受容体の活性を中和する作用を有する抗

体は、メタスチンの血糖上昇作用、膵グルカゴン分泌促進作用、尿生成促進作用を抑制することができるので、血糖低下剤、膵グルカゴン分泌抑制剤、尿生成抑制剤として有用である。

さらには、メタスチンまたはメタスチン受容体の活性を中和する作用
5 を有する抗体は、例えば、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤として使用することができる。糖尿病には、インスリン依存型（I型）糖尿病、インスリン
10 非依存型（II型）糖尿病などが含まれる。

メタスチンまたはメタスチン受容体に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する）を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人に使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液

体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50（polyoxyethylene（50 mol）adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500 mg、とりわけ注射剤では 5～100 mg、その他の剤形では 10～250 mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

(3) 本発明の抗体を含有する診断剤

5 本発明の抗体は、メタスチンまたはメタスチン受容体を認識することができるので、被検液中のメタスチンまたはメタスチン受容体の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。本発明の抗体を用いるメタスチンの定量法は、WO 00 / 2 4 8 9 0 号またはWO 0 1 / 7 5 1 0 4 号に記載の方法に従って実施することができ
10 ける。

したがって、本発明の抗体は、メタスチンまたはメタスチン受容体の異常発現（過剰発現、発現低下）に伴う血糖異常、膵グルカゴン分泌異常、尿生成異常を検出することができる。具体的には、本発明の抗体は、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネ
15 コ、イヌ、サルなど）におけるメタスチンまたはメタスチン受容体の異常発現に伴う血糖異常、膵グルカゴン分泌異常、尿生成異常による肥満、高脂血症、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患、
20 脂肪毒性、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、頻尿、夜尿症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害などの診断剤として使用することができる。

より具体的には、本発明の抗体を用いてメタスチンまたはメタスチン受容体の濃度を定量することによって、メタスチンまたはメタスチン受容体の濃度の減少が検出された場合、例えば、メタスチンまたはメタスチン受容体の機能不全に関連する疾患である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。
25

また、メタスチンまたはメタスチン受容体の濃度の増加が検出された

場合には、例えば、メタスチンまたはメタスチン受容体の過剰発現に起因する疾患である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

メタスチンまたはメタスチン受容体の機能不全に関連する疾患としては、例えば、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリンノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性などが挙げられる。

メタスチンまたはメタスチン受容体の過剰発現に起因する疾患としては、例えば、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害などが挙げられる。糖尿病には、インスリン依存型（I型）糖尿病、インスリン非依存型（II型）糖尿病などが含まれる。

（4）遺伝子診断剤

メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAまたはそれに対するアンチセンス・ポリヌクレオチドは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）におけるメタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAまたはそれに対するアンチセンス・ポリヌクレオチドを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSC

P法（ゲノミックス（Genomics）, 第5巻, 874～879頁（1989年））、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）, 5 第86巻, 2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

具体的には、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAまたはそれに対するアンチセンス・ポリヌクレオチドは、ヒトまたは哺乳動物におけるメタスチンまたはメタスチン受容体の異常発現に伴う血10 糖異常、膵グルカゴン分泌異常、尿生成異常による肥満、高脂血症、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患、脂肪毒性、糖尿病、耐糖能障害、ケトosis、アシドーシス、頻尿、夜尿症、性機能障15 害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害などの診断剤として使用することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションによりメタスチンまたはメタスチン受容体の発現低下が検出された場合は、例えば、メタスチンまたはメタスチン受容体の機能不全に関連する疾患である可能性が高いま20 たは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、ノーザンハイブリダイゼーションによりメタスチンまたはメタスチン受容体の発現過多が検出された場合は、例えば、メタスチンまたはメタスチン受容体の過剰発現に起因する疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

25 メタスチンまたはメタスチン受容体の機能不全に関連する疾患としては、例えば、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性などが挙げられる。

メタスチンまたはメタスチン受容体の過剰発現に起因する疾患としては、例えば、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害などが挙げられる。糖尿病には、インスリン依存型（I型）糖尿病、インスリン非依存型（II型）糖尿病などが含まれる。

（5）アンチセンスDNAを含有する医薬

10 メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAに対するアンチセンスDNAは、メタスチンの血糖上昇作用、膵グルカゴン分泌促進作用、尿生成促進作用を抑制することができるので、血糖低下剤、膵グルカゴン分泌抑制剤、尿生成抑制剤として有用である。

さらには、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAに対するアンチセンスDNAは、例えば、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤として使用することができる。糖尿病には、インスリン依存型（I型）糖尿病、インスリン非依存型（II型）糖尿病などが含まれる。

上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該アンチセンスDNAを、メタスチンをコードするDNAと同様にして製剤化することができる。

25 このようにして得られる製剤は低毒性であり、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。

なお、該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進用の補助剤などの生理学的に認められる担体とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することもできる。

該アンチセンスDNAの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、糖尿病の治療の目的でアンチセンスDNAを臓器（例、肝臓、肺、心臓、腎臓など）に局所投与する場合、成人（体重60kg）に対して、一日あたり約0.1～100mgである。

5 さらに、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするRNAの一部とそれに相補的なRNAとを含有する二重鎖RNA（RNAi；RNA interference法）、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするRNAの一部を含有するリボザイムなどは、上記アンチセンスDNAと同様に、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAの発現を抑制することができ、生体内におけるメタスチンまたはメタスチン受容体、またはメタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAの機能を抑制することができる。

したがって、該二重鎖RNAまたはリボザイムは、メタスチンのの血糖上昇作用、膵グルカゴン分泌促進作用、尿生成促進作用を抑制することができるので、血糖低下剤、膵グルカゴン分泌抑制剤、尿生成抑制剤として有用である。さらには、該二重鎖RNAまたはリボザイムは、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤として使用することができる。糖尿病には、インスリン依存型（I型）糖尿病、インスリン非依存型（II型）糖尿病などが含まれる。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のDNAの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、メタスチンまたはメタスチン受容体のDNAの配列を基に設計して製造することができる。例えば、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするRNAの一部に公知のリボザイ

ムを連結することによって製造することができる。メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得るメタスチンまたはメタスチン受容体のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。

- 5 上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスDNAと同様にして製剤化し、投与することができる。

(6) スクリーニング方法

- 10 本発明のスクリーニング方法は、

(6-1) (a) メタスチンおよび（または）(b) メタスチン受容体（以下、部分ペプチドも含む）を用いることを特徴とする血糖調節薬、膵グルカゴン調節薬または尿生成調節薬のスクリーニング方法、および

- 15 (6-2) (a) メタスチンをコードするDNAを含有するDNAおよび（または）(b) メタスチン受容体をコードするDNAを用いることを特徴とする血糖調節薬、膵グルカゴン調節薬または尿生成調節薬のスクリーニング方法である。

血糖調節薬、膵グルカゴン調節薬または尿生成調節薬としては、

- 20 (a) メタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質、または

(b) メタスチンおよび（または）メタスチン受容体の発現を調節する物質などが挙げられる。

まず、メタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法について説明する。

- 25 メタスチン受容体を用いるか、または組換え型メタスチン受容体の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、メタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質をスクリーニングすることができる。

このような物質には、メタスチン受容体を介して細胞刺激活性を有す

る物質（すなわち、メタスチン受容体アゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない物質（すなわち、メタスチン受容体アンタゴニスト）などが含まれる。「メタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる」とは、メタスチンとメタスチン受容体との結合を阻害する場合と、メタスチンとメタスチン受容体との結合を促進する場合の両方を包含するものである。

細胞刺激活性としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性、細胞増殖阻害活性、遊走阻害活性、腫瘍増殖抑制活性、血糖上昇活性、膵グルカゴン分泌促進活性などが挙げられるが、なかでも細胞内 Ca^{2+} 遊離の促進活性、細胞増殖阻害活性、遊走阻害活性、腫瘍増殖抑制活性、血糖上昇活性、膵グルカゴン分泌促進活性が好ましい。

すなわち、本発明は、（i）メタスチン受容体にメタスチンを接触させた場合と（ii）メタスチン受容体にメタスチンおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするメタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）メタスチン受容体にメタスチンを接触させた場合と（ii）メタスチン受容体にメタスチンおよび試験化合物を接触させた場合における、例えばメタスチン受容体に対するメタスチンの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

本発明のスクリーニング方法は、具体的には、

（i）標識したメタスチンをメタスチン受容体に接触させた場合と、標識したメタスチンおよび試験化合物をメタスチン受容体に接触させた場合における、標識したメタスチンのメタスチン受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするメタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法、

(i i) 標識したメタスチンをメタスチン受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したメタスチンおよび試験化合物をメタスチン受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したメタスチンの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするメタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法、

(i i i) 標識したメタスチンを、メタスチン受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したメタスチン受容体に接触させた場合と、標識したメタスチンおよび試験化合物をメタスチン受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したメタスチン受容体に接触させた場合における、標識したメタスチンの該メタスチン受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするメタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法、

(i v) メタスチン受容体を活性化する化合物（例えば、メタスチン、本発明のメタスチン誘導体）をメタスチン受容体を含有する細胞に接触させた場合と、メタスチン受容体を活性化する化合物および試験化合物をメタスチン受容体を含有する細胞に接触させた場合における、メタスチン受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするメタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法、

(v) メタスチン受容体を活性化する化合物（例えば、メタスチン、本発明のメタスチン誘導体）をメタスチン受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したメタスチン受容体に接触させた場合と、メタスチン受容体を活性化する化合物および試験化合物をメタスチン受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したメタスチン受容体に接触させた場合における、メタスチン受容体を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするメタスチンとメタスチン受容体との結

合性を変化させる物質のスクリーニング方法、

(v i) 試験化合物をメタスチン受容体を含有する細胞に接触させた場合における、メタスチン受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするメタスチン受容体アゴニストのスクリーニング方法

5 、および

(v i i) 試験化合物をメタスチン受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したメタスチン受容体に接触させた場合における、メタスチン受容体を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするメタスチン受容体アゴニストの

10 スクリーニング方法などである。

本発明のスクリーニング方法においては、リガンドとしては、メタスチンを使用する代わりに、メタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる化合物（例えば、低分子合成化合物、好ましくは低分子合成アゴニスト）またはその塩を用いることもできる。このメタスチンとメ
15 タスチン受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩は、例えば、リガンドとしてメタスチンを用いて本発明のスクリーニング方法を実施することによって得ることができる。具体的には、上記した本発明のメタスチン誘導体またはその塩などを用いることができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

20 まず、本発明のスクリーニング方法に用いるメタスチン受容体としては、前記したメタスチン受容体を含有するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたメタス
25 チン受容体などが適している。

本発明のスクリーニング方法において、メタスチン受容体を含有する細胞または該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

メタスチン受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルア

ルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

メタスチン受容体を含有する細胞としては、メタスチン受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、
5 酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリング
ブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による
10 破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（1500
15 0rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したメタスチン受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該メタスチン受容体を含有する細胞や膜画分中のメタスチン受容体の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 1$
20 0^7 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

メタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質をスクリー
25 ニングする前記の（i）～（iii）を実施するためには、適当なメタスチン受容体画分と、標識したメタスチンが用いられる。メタスチン受容体画分としては、天然型のメタスチン受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型メタスチン受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。

標識したメタスチンとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたメタスチンなどを利用することができる。

- 5 具体的には、メタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニングを行うには、まずメタスチン受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッ
- 10 ファーなどのメタスチンとメタスチン受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるメタスチン受容体やメタスチンの分
- 15 解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01～10 mlの該メタスチン受容体溶液に、一定量（5000～500000 cpm）の標識したメタスチンを添加し、同時に 10^{-4} ～ 10^{-1} μM の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）
- 20 を知るために大過剰の未標識のメタスチンを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃～約50℃、望ましくは約4℃～約37℃で約20分～約24時間、望ましくは約30分～約3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ -カ
- 25 ウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（B0）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B0-NSB）を100%とした時、特異的結合量（B-NSB）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

メタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質をスクリ

ーニングする前記の (i v) ~ (v i i) の方法を実施するためには、メタスチン受容体を介する細胞刺激活性を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、メタスチン受容体を含む細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、 Ca^{2+} 、アラキドン酸、cAMP など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なメタスチン受容体を発現した細胞が必要である。本発明のメタスチン受容体を発現した細胞としては、前述の組換え型メタスチン受容体発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

試験化合物は塩を形成していてもよく、試験化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸な

ど) との塩などが用いられる。

また、試験化合物としては、メタスチン受容体の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、リガンド結合ポケットに結合するように設計された化合物が好ましく用いられる。メタスチン受容体の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置の測定は、公知の方法あるいはそれに準じる方法を用いて行うことができる。

メタスチンとメタスチン受容体との結合性を変化させる物質のスクリーニング用キットは、メタスチン受容体、メタスチン受容体を含む細胞または該細胞の膜画分、および(または)メタスチンを含むものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

(1) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05% のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径 0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

(2) メタスチン受容体標品

メタスチン受容体を発現させた CHO 細胞を、12 穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5% CO_2 、95% air で2日間培養したもの。

(3) 標識リガンド

$[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などによって標識したメタスチン

適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μM に希釈する。

(4) リガンド標準液

メタスチンを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含む PB

Sで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

(1) 12穴組織培養用プレートにて培養したメタスチン受容体を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

(2) $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識したメタスチンを5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに 10^{-3} Mのリガンドを5μl加えておく。

(3) 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識メタスチンを0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

(4) 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる物質は、メタスチンとメタスチン受容体との結合を変化させる（結合を阻害または促進する）物質であり、具体的にはメタスチン受容体を介して細胞刺激活性を有する物質（いわゆるメタスチン受容体アゴニスト）または該刺激活性を有しない化合物（いわゆるメタスチン受容体アンタゴニスト）である。

該物質は、前記した試験化合物から選ばれる化合物またはその塩であり、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

メタスチン受容体アゴニストであるか、アンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の(1)または(2)に従えばよい。

(1) 前記(i)～(iii)のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、メタスチンとメタスチン受容体との結合性を
5 変化させる(特に、結合を阻害する)物質を得た後、該物質が上記したメタスチン受容体を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する物質はメタスチン受容体アゴニストであり、該活性を有しない物質はメタスチン受容体アンタゴニストである。

(2) (a) 試験化合物をメタスチン受容体を含有する細胞に接触させ、
10 上記メタスチン受容体を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する物質はメタスチン受容体アゴニストである。

(b) メタスチン受容体を活性化する化合物(例えば、メタスチンなど)をメタスチン受容体を含有する細胞に接触させた場合と、メタスチン受容体を活性化する化合物および試験化合物をメタスチン受容体を含有する細胞に接触させた場合における、メタスチン受容体を介した細胞刺激
15 活性を測定し、比較する。メタスチン受容体を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る物質はメタスチン受容体アンタゴニストである。

指標とする細胞刺激活性としては、例えば、細胞内 Ca^{2+} 遊離の促進活性、細胞増殖阻害活性、遊走阻害活性、腫瘍増殖抑制活性、血糖上昇活性、膵グルカゴン分泌促進活性が好ましい。

メタスチン受容体アゴニストとしては、例えば、前記した本発明のメタスチン誘導体(I)またはその塩のプロドラッグなどが用いられる。

メタスチン受容体アゴニストは、メタスチンが有する生理活性と同様の作用を有しているので、メタスチンと同様に安全で低毒性な医薬として有用である。
25

逆に、メタスチン受容体アンタゴニストは、メタスチンが有する生理活性を抑制することができるので、メタスチンの活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

したがって、メタスチン受容体アゴニストは、例えば、血糖上昇剤、
膵グルカゴン分泌促進剤、尿生成促進剤として有用である。さらには、
メタスチン受容体アゴニストは、例えば、肥満、高脂血症、2型糖尿病
、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮
5 腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インス
リンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒
性の予防・治療剤として有用である。

一方、メタスチン受容体アンタゴニストは、血糖低下剤、膵グルカゴン
分泌抑制剤、尿生成抑制剤として有用である。さらには、メタスチン
10 受容体アンタゴニストは、例えば、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、
アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜
尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化
、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤として使用
することができる。

15 さらに、上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを
用いて得られる物質から誘導される物質も同様に使用することができる
。

上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得
られる物質は塩を形成していてもよく、例えば、生理学的に許容される
20 酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）など
の塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。
この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水
素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロ
ピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リン
25 ゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）
との塩などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質を上述の治療・予
防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例
えば、前記したメタスチンを含有する医薬組成物と同様にして、錠剤、

カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、
5 ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該物質の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、メタスチン受容体アゴニストを経口投与する場合、一般的に成人（体重60kg当たり）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、
10 より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該物質の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、メタスチン受容体アゴニストを注射剤の形で通常成人（体重60kg当たり）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～
15 30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

次に、メタスチンおよび（または）メタスチン受容体の発現を調節する物質のスクリーニング方法について説明する。
20

本発明のスクリーニング方法は、具体的には、

（1）（i）メタスチンを発現し得る細胞または組織を、試験化合物の存在下および非存在下で培養した場合における、それぞれのメタスチンの発現量またはメタスチンをコードするmRNA量を測定し、比較することを特徴とするメタスチンの発現を促進または抑制する物質のスクリーニング方法、
25

（2）（i）メタスチン受容体を発現し得る細胞または組織を、試験化合物の存在下および非存在下で培養した場合における、それぞれのメタスチン受容体の発現量またはメタスチンをコードするmRNA量を測定

し、比較することを特徴とするメタスチン受容体の発現を促進または抑制する物質のスクリーニング方法である。

メタスチンまたはメタスチン受容体を発現し得る細胞または組織としては、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等）の細胞（例えば、神経細胞、内分泌細胞、神経内分泌細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髓細胞、肝細胞、脾細胞、メサングウム細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、樹状細胞）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれらの細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等）、もしくはこれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睪丸（精巣）、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋等を用いても良い。その際、株化細胞、初代培養系を用いてもよい。また、前記したメタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質変換体を使用してもよい。

メタスチンまたはメタスチン受容体を発現し得る細胞の培養方法は、前記した形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、前記の試験化合物の他、DNAライブラリーなどを用いることができる。

メタスチンまたはメタスチン受容体の発現量は抗体などを用いて免疫化学的方法などの公知の方法により測定することもできるし、メタスチンをコードするmRNAをノーザンハイブリダイゼーション法、RT-PCRやTaqMan PCR法を用いて、公知の方法により測定する

こともできる。

mRNAの発現量の比較をハイブリダイゼーション法によって行うには、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold
5 Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行なうことができる。

具体的には、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするmRNAの量の測定は、公知の方法に従って細胞から抽出したRNAと、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAもしくはその一部または本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチドとを接触させ、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAもしくはその一部または本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチドと結合したmRNAの量を測定することによって行われる。メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAもしくはその一部または本発明のアンチセンス・ポリヌ
10 クレオチドを、例えば放射性同位元素、色素などで標識することによって、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAもしくはその一部または本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチドに結合したmRNAの量が容易に測定できる。放射性同位元素としては、例えば³²P、³Hなどが用いられ、色素としては、例えばfluorescein、FAM (PE
15 Biosystems社製)、JOE (PE Biosystems社製)、TAMRA (PE Biosystems社製)、ROX (PE Biosystems社製)、Cy5 (Amersham社製)、Cy3 (Amersham社製)などの蛍光色素が用いられる。

また、mRNAの量は、細胞から抽出したRNAを逆転写酵素によってcDNAに変換した後、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNAもしくはその一部または本発明のアンチセンス・ポリヌクレ
25 オチドをプライマーとして用いるPCRによって、増幅されるcDNAの量を測定することによって行うことができる。

このように、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするmRNAの量を増加させる試験化合物を、メタスチンまたはメタスチン受容体

の発現を促進する活性を有する物質として選択することができ、また、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするmRNAの量を減少させる試験化合物を、メタスチンまたはメタスチン受容体の発現を抑制する活性を有する物質として選択することができる。

5 さらに、本発明は、

(ii) メタスチンまたはメタスチン受容体をコードする遺伝子のプロモーター領域またはエンハンサー領域の下流にレポーター遺伝子を連結した組換えDNAで形質転換した形質転換体を試験化合物の存在下および非存在下で培養した場合における、それぞれのレポーター活性を測定し、比較することを特徴とする当該プロモーター活性を促進または抑制する物質のスクリーニング方法を提供する。

レポーター遺伝子としては、例えば、lacZ (β -ガラクトシダーゼ遺伝子)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、成長因子、 β -グルクロニダーゼ、アルカリホスファターゼ、Green fluorescent protein (GFP)、 β -ラクタマーゼなどが用いられる。

レポーター遺伝子産物 (例、mRNA、タンパク質) の量を公知の方法を用いて測定することによって、レポーター遺伝子産物の量を増加させる試験化合物を本発明のペプチドのプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に促進) する作用を有する化合物、すなわちメタスチンまたはメタスチン受容体の発現を促進する活性を有する物質として選択できる。逆に、レポーター遺伝子産物の量を減少させる試験化合物をメタスチンまたはメタスチン受容体のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に抑制) する作用を有する物質、すなわちメタスチンまたはメタスチン受容体の発現を抑制する活性を有する物質として

20

25

試験化合物としては、前記と同様のものが使用される。

形質転換体の培養は、前記の形質転換体と同様に行うことができる。

レポーター遺伝子のベクター構築やアッセイ法は公知の技術に従うことができる（例えば、Molecular Biotechnology 13, 29-43, 1999）。

メタスチンまたはメタスチン受容体の発現を促進する活性を有する物質は、メタスチンが有する生理活性を促進する作用を有しているので、
5 メタスチンと同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、メタスチンまたはメタスチン受容体の発現を抑制する活性を有する物質は、メタスチンが有する生理活性を抑制することができるので、メタスチンの活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

したがって、メタスチンまたはメタスチン受容体の発現を促進する物質は、例えば、血糖上昇剤、膵グルカゴン分泌促進剤、尿生成促進剤として有用である。さらには、メタスチンまたはメタスチン受容体の発現を促進する物質は、例えば、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリンノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤として有用である。
10
15

一方、メタスチンまたはメタスチン受容体の発現を抑制する物質は、血糖低下剤、膵グルカゴン分泌抑制剤、尿生成抑制剤として有用である。さらには、メタスチンまたはメタスチン受容体の発現を抑制する物質は、例えば、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤として使用することができる。
20

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記したメタスチンの塩と同様のものが用いられる。
25

さらに、上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを

用いて得られる物質から誘導される物質も同様に使用することができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記したメタスチンを含む医薬組成物と同様に、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該物質の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、メタスチンの発現を促進する物質を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgあたり）においては、一日につき該物質を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、メタスチンの発現を促進する物質を注射剤の形で通常成人（体重60kgあたり）に投与する場合、一日につき該物質を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

25 (7) DNA転移動物

本発明は、外来性のメタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の外來性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、

(ii) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(i)記載の動物、

5 (iii) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(ii)記載の動物、および

(iv) 本発明の外來性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外來性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物
10 (以下、本発明のDNA転移動物と略記する)は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階(さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前)に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジ
15 エクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外來性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知
20 の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生
25 物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス(例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など)またはラット(例えば、Wistar, SDなど)などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有しているメタスチンまたはメタスチン受容体（以下、本発明のDNAと略記する）ではなく、
5 いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

10 該異常DNAとしては、異常なメタスチンまたはメタスチン受容体を発現させるDNAを意味し、例えば、正常なメタスチンまたはメタスチン受容体の機能を抑制するペプチドを発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に
15 転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ
20 、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することがで
25 きる。

メタスチンまたはメタスチン受容体の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、
入ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動

物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラストアーゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VN_P）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジ

ヤーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

5 その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

10 正常なメタスチンまたはメタスチン受容体の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として
15 取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

20 該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

25 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配によ

り外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。

- 5 DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

- 10 導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

- 本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的にメタスチンまたはメタスチン受容体の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、メタスチンまたはメタスチン受容体の機能亢進症や、メタスチンまたはメタスチン受容体に関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。
- 15
- 20

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離したメタスチンまたはメタスチン受容体の増加症状を有することから、メタスチンまたはメタスチン受容体に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

- 25 一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的

手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。
5 細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代
10 することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的にメタスチンまたはメタスチン受容体の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。
15 例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、アオエリンまたはメタスチン受容体の機能不活性型不応症における
20 異常メタスチンまたは異常メタスチン受容体による正常メタスチンまたは正常メタスチン受容体の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のメタスチンまたはメタスチン受容体の増加症状を有することから
25 、メタスチンまたはメタスチン受容体の機能不活性型不応症（例、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性）に対する治療薬スクリーニング試験にも

利用可能である。

また、上記２種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば

(１) 組織培養のための細胞源としての使用、

- 5 (２) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、メタスチンまたはメタスチン受容体により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、

- 10 (３) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

(４) 上記(１)記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(５) 本発明の変異ペプチドを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

- 15 さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、メタスチンまたはメタスチン受容体の機能不活性型不応症などを含む、メタスチンまたはメタスチン受容体に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、メタスチンまたはメタスチン受容体に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、
20 該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

- また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。
さらに、メタスチンまたはメタスチン受容体の産生細胞の特定化、アポ
25 トーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、メタスチンまたはメタスチン受容体およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、メタスチンまたはメタス

チン受容体の機能不活性型不応症を含む、メタスチンまたはメタスチン受容体に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または

5 本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、メタスチンまたはメタスチン受容体に関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(8) ノックアウト動物

10 本発明は、メタスチンまたはメタスチン受容体をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する）が不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (i) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- 15 (ii) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第(i)項記載の胚幹細胞、
- (iii) ネオマイシン耐性である第(i)項記載の胚幹細胞、
- (iv) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(i)項記載の胚幹細胞、
- 20 (v) ゲッ歯動物がマウスである第(iv)項記載の胚幹細胞、
- (vi) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (vii) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺
- 25 伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(vi)項記載の非ヒト哺乳動物、
- (viii) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(vi)項記載の非ヒト哺乳動物、
- (ix) ゲッ歯動物がマウスである第(viii)項記載の非ヒト哺乳動物、

および

(x) 第(vii)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーR

NAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

10 また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、
15 これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

25 また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望まし

い。

E S細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに
5 約 10^6 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のE S細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるE S細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるE S細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、E S細胞の遺伝子をロックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

15 このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（ $1\sim 10000$ U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%
20 空気）で約 37°C で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001~0.5%トリプシン/0.1~5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行
25 なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

E S細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M.

J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年 ; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 第78巻、7634頁、1981年 ; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の細胞生物学的検討において有用である。

- 10 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

- 15 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

- 20 本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮

に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のペプチドのヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のペプチドのホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがロックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがロックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1, ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明

のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のペプチドにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のペプチドの生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する物質のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病(例、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性)に対して治療・予防効果を有する物質のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する物質のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、前記と同様のものが用いられる。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与

方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の疾患症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善された場合、該試験化合物を上記の疾患
5 患に対して治療・予防効果を有する物質として選択することができる。

具体的には、該試験化合物を例えば、血糖上昇剤、膵グルカゴン分泌促進剤、尿生成促進剤として、さらには、例えば、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮
10 、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤として使用することができる。

その他、該試験化合物は、血糖上昇機能、膵グルカゴン分泌機能、尿生成機能を調べるための検査薬としても応用できる。

該スクリーニング方法を用いて得られる物質は、上記した試験化合物
15 から選ばれた物質であり、メタスチンまたはメタスチン受容体の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

さらに、上記スクリーニングで得られた物質から誘導される物質も同様
20 に用いることができる。

上記スクリーニング方法で得られた物質は塩を形成していてもよく、該物質の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例え
25 ば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた物質を含有する医薬は、前記したメ

タスチンを含む医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与する
5 ことができる。

該物質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該物質を経口投与する場合、一般的に成人患者（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 200 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該物質の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該物質を注射剤の形で通常成人患者（体重 60 kg として）に投与する場合、一日につき該物質を約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与する
15 のが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

（8b）本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する物質のスクリーニング方法

20 本発明は、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する物質のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明の DNA がレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明の DNA に対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものが用いられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現
5 不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) で置換している場合、本来、本発明のペプチドの発現する組織で、本発明のペプチドの代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (*X-gal*) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、
10 簡便に本発明のペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、*X-gal* を含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/
15 PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、*lacZ* をコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる物質は、上記した試験化合物から選ばれた物質であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性
25 を促進または阻害する物質である。

該スクリーニング方法で得られた物質は塩を形成していてもよく、該物質の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、有機酸など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例え

ば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

- 5 本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する物質は、メタスチンまたはメタスチン受容体の発現を促進し、メタスチンの機能を促進することができるので、例えば、血糖上昇剤、膵グルカゴン分泌促進剤、尿生成促進剤として有用である。

- 10 さらには、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する物質は、例えば、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリンノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤として有用である。

- 15 一方、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する物質は、メタスチンまたはメタスチン受容体の発現を阻害し、メタスチンの機能を阻害することができるので、例えば、血糖低下剤、膵グルカゴン分泌抑制剤、尿生成抑制剤として有用である。

- 20 さらには、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する物質は、例えば、糖尿病、耐糖能障害、ケトosis、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、頻尿、夜尿症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症、動脈硬化、血栓性疾患、消化不良または記憶学習障害の予防・治療剤として使用することができる。

- 25 さらに、上記スクリーニングで得られた物質から誘導される物質も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた物質を含有する医薬は、前記したメタスチンを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、

ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該物質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する物質を経口投与する場合、一般的に成人患者（体重60 kgとして）においては、一日につき該物質を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該物質の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する物質を注射剤の形で通常成人患者（体重60 kgとして）に投与する場合、一日につき該物質を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のペプチドのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

本発明は、更に以下の実施例、製剤例及び試験例によって詳しく説明されるが、これらの例は単なる実施であって、本発明を限定するものではなく、また本発明の範囲を逸脱しない範囲で変化させてもよい。

以下の実施例中の「室温」は通常約 10 °C ないし約 35 °C を示す。
5 。 % は、収率は mol/mol % を、クロマトグラフィーで用いられる溶媒は体積 % を、その他は重量 % を示す。プロトン NMR スペクトルで、OH や NH プロトン等ブロードで確認できないものについてはデータに記載していない。

その他の本文中で用いられている略号は下記の意味を示す。

- | | | |
|----|---------------------------|---|
| 10 | 略名 | 和名 |
| | 10 Ψ, CSNH | : 10 位 C 末端の -CONH ₂ が -CSNH ₂ に置換されていることを示す。 |
| | 1 Ψ 2, CH ₂ NH | : 1 位と 2 位間の -CONH- 結合が -CH ₂ NH- 結合に置換されていることを示す。 |
| 15 | 2 Ψ 3, CH ₂ NH | : 2 位と 3 位間の -CONH- 結合が -CH ₂ NH- 結合に置換されていることを示す。 |
| | 3 Ψ 4, CH ₂ NH | : 3 位と 4 位間の -CONH- 結合が -CH ₂ NH- 結合に置換されていることを示す。 |
| | 4 Ψ 5, CH ₂ NH | : 4 位と 5 位間の -CONH- 結合が -CH ₂ NH- 結合に置換されていることを示す。 |
| 20 | 6 Ψ 7, CSNH | : 6 位と 7 位間の -CONH- 結合が -CSNH- 結合に置換されていることを示す。 |
| | 6 Ψ 7, NHCO | : 6 位と 7 位間の -CONH- 結合が -NHCO- 結合に置換されていることを示す。 |
| 25 | 6 Ψ 7, CH ₂ NH | : 6 位と 7 位間の -CONH- 結合が -CH ₂ NH- 結合に置換されていることを示す。 |
| | 7 Ψ 8, CH ₂ NH | : 7 位と 8 位間の -CONH- 結合が -CH ₂ NH- 結合に置換されていることを示す。 |

8Ψ 9, CH₂NH : 8位と9位間の-CONH-結合が-CH₂NH-結合に置換されていることを示す。

9Ψ 10, CH₂NH : 9位と10位間の-CONH-結合が-CH₂NH-結合に置換されていることを示す。

Abu : 2-アミノブタン酸

Ac : アセチル

AcOEt : 酢酸エチル

AcOH : 酢酸

10 Ala (2-Qui) : 2-キノリルアラニン

Ala (3-Bzt) : 3-ベンゾチエニルアラニン

Arg (Ac) : N^ω-アセチルアルギニン

Arg (Boc₂, Me) : N^{ω, ω'}-ビス-tert-ブトキシカルボニル-N^ω-メチルアルギニン

15 Arg (Et) : N^ω-エチルアルギニン

Arg (Me) : N^ω-メチルアルギニン

Arg (asyMe₂) : 非対称-N^{ω, ω'}-ジメチルアルギニン

Arg (symMe₂) : 対称-N^{ω, ω'}-ジメチルアルギニン

Arg (n-Pr) : N^ω-プロピルアルギニン

20 AzaGly : アザグリシン

β-Ala : ベータアラニン

Boc : tert-ブトキシカルボニル

Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル

Bu^t : tert-ブチル

25 Bzl : ベンジル

CDI : 1, 1'-カルボニルジイミダゾール

Cha : シクロヘキシルアラニン

CIP : 2-クロロ-1, 3-ジメチルイミダゾリウムテトラフルオロボレート

	Cit	: シトルリン
	Clt resin	: 2-クロロトリチルレジン
	Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	Dab	: 1, 4-ジアミノブタン酸
5	Dap	: 1, 3-ジアミノプロピオン酸
	Dap (Gly)	: N ^β -グリシルジアミノプロピオン酸
	Dap (GnGly)	: N ^β -(N-グアニジノグリシル) ジアミノプロピオン酸
	DCM	: ジクロロメタン
	DEA	: ジエチルアミン
10	DIEA	: N, N'-ジイソプロピルエチルアミン
	DMF	: N, N-ジメチルホルムアミド
	EDT	: エタンジチオール
	Fmoc	: 9-フルオレニルメトキシカルボニル
	Gn	: グアニジノ
15	Har	: ホモアルギニン
	Har (Me)	: N ^ω -メチルホモアルギニン
	HOAt	: 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール
	HOBt	: 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
	HONB	: N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキミド
20	Hph	: ホモフェニルアラニン
	IndPr	: 3-(インドール-3-イル) プロピオニル
	Lys (Me ₂)	: N ^{ε, ε} -ジメチルリジン
	MBHA	: p-メチルベンズヒドリルアミン
	MeOH	: メタノール
25	N((CH ₂) ₃ Gn) Gly	: N-(3-グアニジノプロピル) グリシン
	Nal (1)	: 1-ナフチルアラニン
	Nal (2)	: 2-ナフチルアラニン
	Nar	: ノルアルギニン
	Nar (Me)	: N ^ω -メチルノルアルギニン

	Nle	: ノルロイシン
	NMeArg	: N ^α -メチルアルギニン
	NMeLeu	: N ^α -メチルロイシン
	NMePhe	: N ^α -メチルフェニルアラニン
5	NMeSer	: N ^α -メチルセリン
	Orn	: オルニチン
	Orn (Mtt)	: N ^δ -(4-メチルトリチル) オルニチン
	PAL	: 5-(4-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)-アミノ メチル-3, 5-ジメトキシフェノキシ) 吉草酸
10	Pbf	: 2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロペンゾフラン-5- スルフォニル
	Phe (2Cl)	: 2-クロロフェニルアラニン
	Phe (2F)	: 2-フルオロフェニルアラニン
	Phe (3, 4Cl ₂)	: 3, 4-ジクロロフェニルアラニン
15	Phe (3, 4F ₂)	: 3, 4-ジフルオロフェニルアラニン
	Phe (3CF ₃)	: 3-トリフルオロメチルフェニルアラニン
	Phe (3Cl)	: 3-クロロフェニルアラニン
	Phe (3F)	: 3-フルオロフェニルアラニン
	Phe (4Cl)	: 4-クロロフェニルアラニン
20	Phe (4CN)	: 4-シアノフェニルアラニン
	Phe (4F)	: 4-フルオロフェニルアラニン
	Phe (4Gn)	: 4-グアニジノフェニルアラニン
	Phe (4NH ₂)	: 4-アミノフェニルアラニン
	Phe (4NO ₂)	: 4-ニトロフェニルアラニン
25	Phe (4CN)	: 4-シアノフェニルアラニン
	Phe (F ₅)	: ペンタフルオロフェニルアラニン
	Phe Ψ (CSNH)-NH ₂	: C末端のフェニルアラニルアミドがフェニルアラニ ルチオアミドで置換されていることを示す
	Phg	: フェニルグリシン

	PhOH	: フェノール
	PhSMe	: チオアニソール
	Pro	: プロリン
	Pya (2)	: 2-ピリジルアラニン
5	Pya (3)	: 3-ピリジルアラニン
	Pya (4)	: 4-ピリジルアラニン
	PyAOP	: (7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)-トリ ス (ピロリジノ) ホスホニウムヘキサフルオロフォスフェイト
	PyBOP	: (ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)-トリス (ピ 10 ロリジノ) ホスホニウムヘキサフルオロフォスフェイト
	PyBrop	: プロモ-トリス (ピロリジノ) ホスホニウムヘキサ フルオロフォスフェイト
	Sar	: N-メチルグリシン
	Tle	: tert-ロイシン
15	Trp (For)	: N ¹ -ホルミルトリプトファン
	Tyr (Me)	: O-メチルチロシン
	Tyr Ψ (CH ₂ NH) Asn	: TyrとAsnとの間の-CONH-結合が-CH ₂ NH-結合に置 換されていることを示す。
	TFA	: トリフルオロ酢酸
20	TFE	: トリフルオロエタノール

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する
場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature
による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、そ
25 の例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特
に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン

	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	Y	: チミンまたはシトシン
5	N	: チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
	R	: アデニンまたはグアニン
	M	: シトシンまたはアデニン
	W	: チミンまたはアデニン
	S	: シトシンまたはグアニン
10	R N A	: リボ核酸
	m R N A	: メッセンジャーリボ核酸
	d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸
	d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
	d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
15	d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
	A T P	: アデノシン三リン酸
	E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
	T F A	: トリフルオロ酢酸
20	E I A	: エンザイムイムノアッセイ
	G l y または G	: グリシン
	A l a または A	: アラニン
	V a l または V	: バリン
	L e u または L	: ロイシン
25	I l e または I	: イソロイシン
	S e r または S	: セリン
	T h r または T	: スレオニン
	C y s または C	: システイン
	M e t または M	: メチオニン

- G l u または E : グルタミン酸
A s p または D : アスパラギン酸
L y s または K : リジン
A r g または R : アルギニン
5 H i s または H : ヒスチジン
P h e または F : フェニルアラニン
T y r または Y : チロシン
T r p または W : トリプトファン
P r o または P : プロリン
10 A s n または N : アスパラギン
G l n または Q : グルタミン
p G l u : ピログルタミン酸

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

- 15 配列番号 : 1

ヒト由来メタスチン (Metastin) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 : 2

ヒトメタスチンをコードする DNA の塩基配列を示す。

配列番号 : 3

- 20 マウスメタスチン前駆体 (A) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 : 4

マウスメタスチン前駆体 (A) をコードする DNA の塩基配列を示す。
。形質転換体エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) D H 1 0 B / p
C M V - m K i S S - 1 に保持されるプラスミド p C M V - m K i S S

- 25 - 1 に含まれる塩基配列である。

配列番号 : 5

マウスメタスチン前駆体 (B) のアミノ酸配列を示す。

配列番号 : 6

マウスメタスチン前駆体 (B) をコードする DNA の塩基配列を示す

。形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) DH5 α /pCR2.1-mKISS-1.4Aに保持されるプラスミドpCR2.1-mKISS-1.4Aに含まれる塩基配列である。

配列番号：7

- 5 ラット由来メタスチン前駆体のアミノ酸配列を示す。

配列番号：8

ラットメタスチン前駆体をコードするDNAの塩基配列を示す。

配列番号：9

ヒトOT7T175 (メタスチン受容体) のアミノ酸配列を示す。

- 10 配列番号：10

ヒトOT7T175 (メタスチン受容体) をコードするDNAの塩基配列を示す。

配列番号：11

ラットOT7T175 (メタスチン受容体) のアミノ酸配列を示す。

- 15 配列番号：12

ラットOT7T175 (メタスチン受容体) をコードするDNAの塩基配列を示す。

配列番号：13

マウスOT7T175 (メタスチン受容体) のアミノ酸配列を示す。

- 20 配列番号：14

マウスOT7T175 (メタスチン受容体) をコードするDNAの塩基配列を示す。

配列番号：15

ヒトメタスチン15 (40-54) のアミノ酸配列を示す。

- 25 配列番号：16

ヒトメタスチン10 (45-54) (MS10) のアミノ酸配列を示す。

配列番号：17

ヒトメタスチン9 (46-54) のアミノ酸配列を示す。

配列番号：18

ヒトメタスチン8（47-54）のアミノ酸配列を示す。

配列番号：19

5 ヒトメタスチン15（40-54）をコードするDNAの塩基配列を示す。

配列番号：20

ヒトメタスチン10（45-54）をコードするDNAの塩基配列を示す。

配列番号：21

10 ヒトメタスチン9（46-54）をコードするDNAの塩基配列を示す。

配列番号：22

ヒトメタスチン8（47-54）をコードするDNAの塩基配列を示す。

15

形質転換体エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）DH10B／pCMV-mKISS-1は、平成12（2000）年1月24日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧通商
20 産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH））に寄託番号FERMBP-7003として、平成11（1999）年12月16日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85の財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16348として寄託されている。

形質転換体エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）DH5 α ／pCR2.1-mKISS-1.4Aは、平成12年3月6日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧通商産業省
25 工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH））に寄託番号FERMBP-7073として、平成12年2月16日から財団法人・発酵研究

所 (I F O) に寄託番号 I F O 1 6 3 6 0 として寄託されている。

本発明において、Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂ (配列番号 : 1 6) をメタスチン 1 0 (Metastin10)、すなわちMS10と表
5 記する。

後述する実施例において、MS10のN末端のTyrの位置を1位、C末端のPheの位置を10位と数える。

Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

10 例えば、化合物番号79 (実施例1) の [Hph10] MS10はMS10のC末端 (10位) のPheがHphに置換されたペプチドであることを意味する。

例えば、化合物番号4のdes(1)-MS10はN末端 (1位) のTyrを欠失させたペプチドであることを意味する。

例えば、化合物番号53のdes(1-3)-Fmoc-MS10はN末端 (1~3位) の
15 Tyr-Asn-Trpを欠失させ、4位のAsnのアミノ基にFmocを修飾したペプチドであることを意味する。

実施例

実施例1 (合成法A) : [Hph10] MS10 (化合物番号79) の製造

20 市販のPAL resin にFmoc-Hph を導入することで調製したFmoc-Hph-PAL resin (sub. 0.39 mmol / g) 51 mg を用い、マルチペプチドシンセサイザー ACT-396 によりペプチド鎖を伸長し、Tyr (Bu^t) Asn (Trt) Trp (Boc) Asn (Trt) Ser (Bu^t) PheGlyLeuArg (Pbf) Hph-PAL resin を得た。うち、18.2 mg に TFA / PhSMe / m-cresol
25 / TIS / EDT (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 200 μL を加え 2 時間振盪した。反応溶液にジエチルエーテルを加え沈殿を得、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗浄を行い、残渣を酢酸水溶液で抽出、濾過により樹脂を除いた後、YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム (20 x 150mm) を用いた分取HPLCで、A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリル

によるA/B: 73/27~63/37への直線型濃度勾配溶出(30分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末2.6mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1316.5 (計算値1316.7)

HPLC溶出時間: 20.6 分

5 溶出条件

カラム: Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液: A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100/0~30/70へ。直線型濃度勾配溶出(35分)。

流速: 1.0ml/分

10

実施例2 (合成法B): [Trp(For)10]MS10(化合物番号186)の製造法

市販 2-chlorotritylchloride resin (Clt resin, 1.33mmol/g) に Fmoc-Arg(Pbf)-OH を導入したFmoc-Arg(Pbf)-O-Clt resin (sub. 0.33 mmol / g) 379 mg を用い、ABI 433A を用いペプチド鎖を伸長し、
15 Boc-Tyr(Bu^t)Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu^t)PheGlyLeuArg(Pbf)-O-Clt resin を 540 mg 得た。うち 270 mg に AcOH / TFE / DCM (1 / 1 / 8) 10 mL を加え、30 分振盪した。樹脂をろ去後溶媒を濃縮し、AcOEt に溶解後、satd NaCl aq. で洗浄した。Na₂SO₄ で乾燥後溶媒を濃縮し、ジエチルエーテル・石油エーテルを加え、沈殿としてBoc-Tyr(Bu^t)Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu^t)PheGlyLeuArg(Pbf)-OHを得た 68 mg。うち22 mg に HCl H-Trp(For)-NH₂ (Boc-Trp(For)-NH₂ を 9.7 N HCl / dioxane、0 °C、30 分処理することにより調製) 4 mg、PyAOP 10 mg、HOAt 5 mg、DIEA 11

25 μL を加え、15 時間攪拌した。溶媒を濃縮し、クロロホルム・ジエチルエーテルを加え沈殿とし Boc-Tyr(Bu^t)Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu^t)PheGlyLeuArg(Pbf)Trp(For)-NH₂を得た。これに TFA / PhSMe / m-cresol / TIS / EDT (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 1 mL を加え 2 時間攪拌した。反応溶液にジエ

チルエーテルを加え沈殿を得、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗淨を行い、残渣を酢酸水溶液で抽出、濾過により樹脂を除いた後、YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム (20 x 150mm) を用いた分取HPLCで、A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B：73/27～
 5 63/37への直線型濃度勾配溶出 (30分) を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末2.0mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1369.3 (計算値1369.6)

HPLC溶出時間：19.6 分

溶出条件

10 カラム：Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：100/0～30/70へ。直線型濃度勾配溶出 (35分)。

流速：1.0ml/分

15 実施例3 (合成法C)：[10Ψ, CSNH]MS10 (化合物番号128) の製造

Boc-Phe-NH₂ 264 mg を THF 20 mL に溶解後、Lawesson's reagent 1.62 g を加え 24 時間攪拌した。不溶物をろ去後溶媒を濃縮し、AcOEt に溶解後 satd NaHCO₃ aq.、satd NaCl aq. で洗淨した。Na₂SO₄ で乾燥後溶媒を濃縮し、フラッシュカラムクロマトグラフィーにより精
 20 製した。ジエチルエーテル・石油エーテルを加え沈殿として (S)-2-tert-Butoxycarbonylamino-3-phenylpropanethioamide (Boc-Phe Ψ (CSNH)-NH₂) を得た 275 mg (収率 98%)。うち 42 mg を 0 °C 下 9.7 N HCl 処理による脱Boc後、10% DEA / DMF 処理による脱Fmoc, PyBOP / HOBt法による縮合を繰り返しFmoc-LeuArg (Pbf) PheΨ (CSNH)-NH₂ を
 25 得た 66 mg (収率 93%)。実施例2と同様にして調製した Boc-Tyr (Bu^t) Asn (Trt) Trp (Boc) Asn (Trt) Ser (Bu^t) PheGly-OH 17 mg に H-LeuArg (Pbf) Phe Ψ (CSNH)-NH₂ (Fmoc-LeuArg (Pbf) Phe Ψ (CSNH)-NH₂ 14 mg を 10% DEA / DMF 処理することにより調製)、PyBrop 9 mg、HOAt 3 mg、DIEA 7 mL を加え、15 時間攪拌した。溶媒を濃縮し、クロロホ

ルム・ジエチルエーテルを加え沈殿とした。うち 10 mg に TFA /
 PhSMe / m-cresol / TIS / EDT (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 100 μ L
 を加え 2 時間攪拌した。反応溶液にジエチルエーテルを加え沈殿を得
 、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗浄を行い、残渣を酢酸水溶
 5 液で抽出、濾過により樹脂を除いた後、YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラ
 ム (20 x 150mm) を用いた分取HPLCで、A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA
 含有アセトニトリルによるA/B: 72/28~62/38への直線型濃度勾配溶出
 (30分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末1.0mgを得
 た。

10 質量分析による (M+H)⁺ 1318.4 (計算値1318.6)

HPLC溶出時間: 21.8 分

溶出条件:

カラム: Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液: A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い
 15 、A/B: 100/0~30/70へ。直線型濃度勾配溶出(35分)。

流速: 1.0ml/分

実施例 4 (合成法D): [6 Ψ 7, CH₂NH]MS10 (化合物番号163) の製造

市販のPAL resin にFmoc-Phe を導入することで調製したFmoc-Phe-
 20 PAL resin 321 mg を用い ABI 433A によりペプチド鎖を伸長し、
 Fmoc-LeuArg (Pbf) Phe-PAL

resin を得た。うち半量に Fmoc-Gly を縮合し Fmoc-
 GlyLeuArg (Pbf) Phe-PAL resin を 190 mg 得た。うち 76 mg を脱
 Fmoc 後、DMF 2 mL、AcOH 50 μ L、Fmoc-Phe-H 46 mg、NaBH₃CN 8 mg
 25 を加え、1 時間振盪した。樹脂を洗浄後 DMF 2 mL、DIEA 22 μ L、Z-
 Cl 18 μ L を加え 3 時間振盪した。樹脂を洗浄後 ABI 433A

を用いペプチド鎖を伸長し、Boc-
 Tyr (Bu^t) Asn (Trt) Trp (Boc) Asn (Trt) Ser (Bu^t) Phe Ψ
 (CH₂NZ) GlyLeuArg (Pbf) Phe-PAL resin を得た。うち 15 mg に氷冷下、

TMS-Br 46 μ L、PhSMe 42 μ L、m-cresol 38 μ L、EDT 18 μ L、TFA 227 μ L を加え、2 時間攪拌した。溶媒を留去後ジエチルエーテルを加え沈殿を得、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗浄を行い、残渣を酢酸水溶液で抽出、濾過により樹脂を除いた後、YMC D-ODS-5-ST
5 S-5 120A カラム (20 x 150mm) を用いた分取HPLCで、A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B：72/28～62/38への直線型濃度勾配溶出 (30分) を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末 2.0mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1288.7 (計算値1288.7)

10 HPLC溶出時間：18.2 分

溶出条件：

カラム：Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：100/0～0/70へ。直線型濃度勾配溶出 (35分)。

15 流速：1.0ml/分

実施例 5 (合成法 E)：[Arg(Me)₉]MS10 (化合物番号82) の製造
/ 60% NaH in oil 360 mg を dry DMF 20 mL に溶解し、N,N'-Bis-Boc-1-guanylpurazole 2793 mg の dry DMF 溶液 10 mL を 0 °C 下加
20 え、10 分間攪拌した。methyl iodide 748 μ L を加え、室温にて 24 時間攪拌した。溶媒を留去後 AcOEt に溶解し satd NaHCO₃ aq.、satd NaCl aq. で洗浄した。Na₂SO₄で乾燥後溶媒を濃縮し、フラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し N-Methyl-N,N'-bis-Boc-1-guanylpurazoleを得た 2.96 g (収率 91%)。市販のRink Amide MBHA
25 resin にFmoc-Phe を導入することで調製したFmoc-Phe-Rink Amide MBHA resin 480 mg を用い ABI 433A によりペプチド鎖を伸長し、Boc-
Tyr (Bu^t) Asn (Trt) Trp (Boc) Asn (Trt) Ser (Bu^t) PheGlyLeuOrn (Mtt) Phe-Rink Amide MBHA resin を 1080 mg 得た。うち540 mg に TFA / TIS

/ DCM (1 / 5 / 94) 10 mL を加え 50 分間振盪した。樹脂を洗浄後乾燥し 2/5 量に DMF 2 mL、先に調製した N-Methyl-N,N'-bis-Boc-1-guanylpurazole 49 mg、DIEA 87 μ L を加え 15 時間振盪し Boc-Tyr (Bu^t) Asn (Trt) Trp (Boc) Asn (Trt) Ser (Bu^t) PheGlyLeuArg (Boc₂, Me) Phe-
5 Rink Amide MBHA resin を 220 mg 得た。うち 50 mg に TFA / PhSMe / m-cresol / TIS

/ EDT (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 1 mL を加え 2 時間攪拌した。反応溶液にジエチルエーテルを加え沈殿を得、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗浄を行い、残渣を酢酸水溶液で抽出、濾過により樹脂を
10 除いた後、YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム (20 x 150mm) を用いた分取 HPLC で、A 液：0.1%TFA-水、B 液：0.1%TFA 含有アセトニトリルによる A/B：74/26 ~ 64/36 への直線型濃度勾配溶出 (30分) を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末 10.5 mg を得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1316.5 (計算値 1316.7)

15 HPLC 溶出時間：20.1 分

溶出条件：

カラム：Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液：A 液：0.1%TFA-水、B 液：0.1%TFA 含有アセトニトリルを用い、A/B：100/0 ~ 30/70 へ。直線型濃度勾配溶出 (35分)。

20 流速：1.0ml/分

実施例 6 (合成法 F)：[6 Ψ 7, CSNH] MS10 (化合物番号 166) の製造

HCl H-Gly-OBu^t 503 mg を DMF 10 mL に溶解し、0 °C 下 Fmoc-Phe 1162 mg、HOBt 608 mg、PyBOP 1874 mg、DIEA 784 μ L を加え、4
25 時間攪拌した。溶媒を濃縮し、AcOEt に溶解後 1N HCl aq.、satd NaHCO₃ aq.、satd NaCl aq. で洗浄した。Na₂SO₄ で乾燥後溶媒を濃縮し、ジエチルエーテル・石油エーテルを加え、沈殿として Fmoc-PheGly-OBu^t を得た 1.48 g (収率 99%)。うち 250 mg を toluene 10 mL に溶解後、Lawesson's reagent 404 mg を加え 80 °C 下 2 時間攪拌した

。溶媒を濃縮し、AcOEt に溶解後 satd NaHCO₃ aq.、satd NaCl aq. で洗淨した。Na₂SO₄ で乾燥後溶媒を濃縮し、フラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し、ジエチルエーテル・石油エーテルを加え沈殿としてFmoc-PheΨ (CSNH) Gly-OBu^tを得た 207 mg (収率 80%)。うち103
5 mg に TFA / H₂O (95 / 5)

を加え 1 時間攪拌した。溶媒を濃縮後、ジエチルエーテルを加え沈殿としてFmoc-PheΨ (CSNH) Gly-OHを得た 82.4 mg (収率 90%)。市販の PAL resin にFmoc-Phe を導入することで調製したFmoc-Phe-PAL resin を用い ABI 433A によりペプチド鎖を伸長したFmoc-LeuArg (Pbf) Phe-
10 PAL resin 80 mg を脱 Fmoc 後、 Fmoc-PheΨ (CSNH) Gly-OH 35 mg、PyBrop 47 mg、HOAt 14 mg、DIEA 35 μL を加え 15 時間振盪した。樹脂を洗淨後 ABI 433A を用いペプチド鎖を伸長し、Boc-Tyr (Bu^t) Asn (Trt) Trp (Boc) Asn (Trt) Ser (Bu^t) Phe
Ψ (CSNH) GlyLeuArg (Pbf) Phe-PAL resin を得た。うち 15 mg に TFA /
15 PhSMe / m-cresol / TIS / EDT (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 200 μL を加え 2 時間攪拌した。反応溶液にジエチルエーテルを加え沈殿を得、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗淨を行い、残渣を酢酸水溶液で抽出、濾過により樹脂を除いた後、YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム (20 x 150mm) を用いた分取HPLCで、A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA
20 含有アセトニトリルによるA/B：77/23~57/43への直線型濃度勾配溶出 (60分) を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末1.0 mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1318.7 (計算値1318.6)

HPLC溶出時間：20.8 分

25 溶出条件：

カラム：Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：100/0~30/70へ。直線型濃度勾配溶出 (35分)。

流速：1.0ml/分

実施例 7 (合成法 G) : [AzaGly7]MS10 (化合物番号176) の製造

市販のPAL resin にFmoc-Phe を導入することで調製したFmoc-Phe-PAL resin 321 mg を用い、ABI 433A によりペプチド鎖を伸長すること
5 とで得たFmoc-LeuArg(Pbf)Phe-PAL resin 80 mg を脱 Fmoc 後、 THF 2 mL、CDI 16 mg を加え 2 時間振盪した。Hydrazine monohydrate 6 μ L を加え1時間振盪した後樹脂を洗浄した。Fmoc-Phe 39 mg、PyBrop 93 mg、HOAt 27 mg、DIEA 105 μ L を加え 2 時間振盪した。樹脂を洗浄後、ABI 433A を用いペプチド鎖を伸長し、Boc-
10 Tyr (Bu^t) Asn (Trt) Trp (Boc) Asn (Trt) Ser (Bu^t) PheAzaGlyLeuArg (Pbf) Phe-PAL resin を得た。うち 25 mg に TFA / PhSMe / m-cresol / TIS / EDT (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 1 mL を加え 2 時間振盪した。反応溶液にジエチルエーテルを加え沈殿を得、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗浄を行い、残渣を酢酸水溶液で抽出、濾過により樹脂を除いた後、
15 YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム (20 x 150mm) を用いた分取HPLC で、A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B：74/26~64/36への直線型濃度勾配溶出 (30分) を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末5.5 mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1303.3 (計算値1303.6)

20 HPLC溶出時間：18.9 分

溶出条件：

カラム：Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：100/0~30/70へ。直線型濃度勾配溶出 (35分)。

25 流速：1.0ml/分

実施例 8 (合成法 H) : [D-Tyr1, AzaGly7, Arg (Me) 9]MS10 (化合物番号232) の製造

市販 Rink Amide MBHA resin (0.55mmol/g) 4g に Fmoc-Phe, Fmoc-

Orn (Mtt) を導入することで調製した Fmoc-Orn (Mtt)-Phe- Rink Amide MBHA resin に TFA / TIS / DCM (1 / 5 / 94) 50 mL を加え 50 分間振盪した。樹脂を洗浄後 DCM 40 mL、実施例 5 で調製した N-Methyl-N,N'-bis-Boc-L-guanylpurazole 2.27 g を加え、DIEA を加え溶液の pH を 9 に調製し 15 時間振盪し Fmoc-Arg (Boc₂, Me) Phe-Rink Amide MBHA resin 4.74g を得た。別途 Fmoc-NHNH₂ HCl 145 mg を THF 10 mL に懸濁し、氷冷下 CDI 89 mg、DIEA 87 mL を加え、室温にて 1 時間攪拌した。氷冷下 H-Leu-OBu^t HCl 224 mg の DMF 5 mL 溶液を加え、室温に戻しながら 18 時間攪拌した。溶媒を留去後 AcOEt に溶解し 1N HCl aq.、satd NaHCO₃ aq.、satd NaCl aq. で洗浄した。Na₂SO₄ で乾燥後溶媒を濃縮し、フラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し Fmoc-AzaGly-Leu-OBu^t 230 mg (収率 99%) を得た。うち 187 mg に TFA / H₂O (9 / 1) 10 mL を加え 1 時間攪拌した。溶媒を留去後 AcOEt に溶解し satd NaCl aq. で洗浄した。Na₂SO₄ で乾燥後溶媒を濃縮し、ジエチルエーテルを加え沈殿として Fmoc-AzaGly-Leu-OH 143 mg を得た (収率 87%)。得られた Fmoc-AzaGly-Leu-OH、Trt-Phe を Fmoc-Arg (Boc₂, Me) Phe-Rink Amide MBHA resin に導入することで調製した Trt-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Boc₂, Me) Phe-Rink Amide MBHA resin に TFA / TIS / DCM (1 / 5 / 94) 50 mL を加え 50 分間振盪した。樹脂を洗浄、中和後 Fmoc-Ser (Bu^t) 続いて Fmoc-Asn (Trt) を導入した。得られた Fmoc-Asn (Trt) Ser (Bu^t) Phe-AzaGly-LeuArg (Boc₂, Me) Phe-Rink Amide MBHA resin のうち 80.3mg を用いペプチド鎖を伸長し H-D-Tyr (Bu^t) Asn (Trt) Trp (Boc) Asn (Trt) Ser (Bu^t) Phe-AzaGly-LeuArg (Boc₂, Me) Phe-Rink Amide MBHA resin 97.2mg を得た。得られた樹脂に TFA / PhSMe / m-cresol / H₂O / TIS / EDT (80 / 5 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 1 mL を加え 90 分攪拌した。反応溶液にジエチルエーテルを加え沈殿を得、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗浄を行い、残渣を酢酸水溶液で抽出、濾過により樹脂を除いた後、YMC SH-343-5 S-5, 120A カラム (20 x 250mm) を用いた分取 HPLC で、A 液: 0.1% TFA-水、

B液：0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B：76/24～66/34への直線型濃度勾配溶出(60分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末11.7mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1317.0 (計算値1317.6)

5 HPLC溶出時間：21.0 分

溶出条件：

カラム：Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：100/0～30/70へ。直線型濃度勾配溶出(35分)。

10 流速：1.0ml/分

実施例 9 (合成法 I) : des(1-3)-3-pyridinepropionyl-[AzaGly7, Arg(Me)9]MS10 (化合物番号322) の製造

実施例 8 にて調製した Fmoc-Asn(Trt)Ser(Bu^t)Phe-AzaGly-
15 LeuArg(Boc₂, Me)Phe-Rink Amide MBHA resinのうち48.2mgを脱Fmoc後、市販 3-pyridinepropionic acid 15.2mg, DIPCDI 15.9 μL, 0.5M HOAt/DMF溶液 200 μLで室温90分処理した。得られた樹脂を洗浄乾燥後、TFA / PhSMe / m-cresol / H₂O / TIS / EDT (80 / 5 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 1 mL を加え 90 分撹拌した。反応溶液にジエチルエーテルを
20 加え沈殿を得、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗浄を行い、残渣を酢酸水溶液で抽出、濾過により樹脂を除いた後、YMC SH-343-5 S-5, 120Aカラム(20 x 250mm)を用いた分取HPLCで、A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B：80/20-60/40への直線型濃度勾配溶出(60分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末
25 6.0mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 987.4 (計算値987.5)

HPLC溶出時間：8.1 分

溶出条件：

カラムYMC-AM301 (4.6 x 100mm)

溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：80/20～30/70へ。直線型濃度勾配溶出(25分)。

流速：1.0ml/分

5 実施例 10 (合成法 J) : des(1-2)-Amidino-[AzaGly7, Arg(Me)9]MS10 (化合物番号273) の製造

実施例 8 にて調製した Fmoc-Asn(Trt)Ser(Bu^t)Phe-AzaGly-LeuArg(Boc₂, Me)Phe-Rink Amide MBHA resin 48.2mgにFmoc-Trp(Boc)を導入後脱Fmocし、H-Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu^t)Phe-AzaGly-
10 LeuArg(Boc₂, Me)Phe-Rink Amide MBHA resinを得た。得られた樹脂をDMF中N,N'-bis-Boc-L-guanylpurazole 29.3mg, DIEA 34.8 μ Lで室温14時間処理し、Amidino-Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu^t)Phe-AzaGly-LeuArg(Boc₂, Me)Phe-Rink Amide MBHA resinを得た。得られた樹脂を洗浄乾燥後、TFA / PhMe / m-cresol / H₂O / TIS / EDT (80 / 5 / 5 /
15 5 / 2.5 / 2.5) 1 mL を加え 90 分撹拌した。反応溶液にジエチルエーテルを加え沈殿を得、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗浄を行い、残渣を酢酸水溶液で抽出、濾過により樹脂を除いた後、YMC SH-343-5 S-5, 120Aカラム(20 x 250mm)を用いた分取HPLCで、A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B：78/22-58/42
20 への直線型濃度勾配溶出(60分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末0.6mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1082.3 (計算値1082.6)

HPLC溶出時間：11.4 分

溶出条件：

25 カラム：YMC-AM301 (4.6 x 100mm)

溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：80/20～30/70へ。直線型濃度勾配溶出(25分)。

流速：1.0ml/分

実施例 1 1 (合成法 K) : [6Ψ7, NHCO, D-Tyr1, Arg (Me) 9]MS10 (化合物番号319) の製造

Z-Phe 5.99 g を MeCN 30 mL に溶解し、0 °C 下 HONB 3.94 g、WSCD HCl 4.59

- 5 g を加え、室温にて 4 時間攪拌した。0 °C 下 25% NH₃aq. 3.4 mL、DMF 10 mL を加え 4 時間攪拌した。溶媒を留去後 AcOEt に溶解し 1N HCl aq.、satd. NaHCO₃ aq.、satd. NaCl aq. で洗浄した。Na₂SO₄で乾燥後溶媒を濃縮し、ジエチルエーテルを加え、沈殿として Z-Phe-NH₂を得た 1.48 g (収率 99%)。[Bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzene 1.94 g を
- 10 MeCN 20 mL、H₂O 5 mL に溶解後、0 °C 下 先に調製した Z-Phe-NH₂ 890 mg、pyridine 972 μL を加え、室温にて 15 時間攪拌した。溶媒を濃縮後ジエチルエーテル- 1N HCl aq. で分液し、1N HCl aq. 層を濃縮後乾燥した。半量を DMF 5 mL に溶解し、mono-tert-Butyl malonate 486 μL、HOBt 540 mg を加えた後、0 °C 下 PyBOP 2.08 g、DIEA
- 15 1394 μL を加え、室温にて 15 時間攪拌した。溶媒を留去後 AcOEt に溶解し 1N HCl aq.、satd NaHCO₃ aq.、satd NaCl aq. で洗浄した。Na₂SO₄で乾燥後溶媒を濃縮し、フラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製後ジエチルエーテル・石油エーテルを加え、沈殿として Z-PheΨ (NHCO) Gly-OBu^tを得た 304 mg (収率 33%)。うち 154 mg
- 20 を MeOH 20 mL に溶解後 10% Pd-C を加え、水素気流下 2 時間接触還元を行った。触媒をろ去後溶媒を濃縮し、乾燥した。これを MeCN 10 mL に溶解し、Fmoc-OSu 152 mg、DIEA 78 μL を加え 15 時間攪拌した。溶媒を留去後 AcOEt に溶解し 1N HCl aq.、satd. NaHCO₃ aq.、satd. NaCl aq. で洗浄した。Na₂SO₄で乾燥後溶媒を濃縮し、ジエチルエーテル・石油エーテルを加え、沈殿として Fmoc-PheΨ (NHCO) Gly-OBu^tを得た 127 mg (収率 68%)。実施例 10 にて調製した Fmoc-Arg (Boc₂, Me) Phe-Rink Amide MBHA resin 63 mg に Fmoc-Leu を導入、脱 Fmoc 後、Fmoc-PheΨ (NHCO) Gly-OH (Fmoc-PheΨ (NHCO) Gly-OBu^t 25 mg TFA 3 分処理により調製)、0.5M HOAt 300 μL、PyAOP 78 mg、

DIEA 52 μ L を加え 6 時間振盪した。樹脂を洗浄後 DMF 2 mL、DIEA 9 μ L、Ac₂O 12 μ L を加え 30 分振盪した。樹脂を洗浄後 ABI 433A を用いペプチド鎖を伸長し、Boc- β -Tyr (Bu¹) Asn (Trt) Trp (Boc) Asn (Trt) Ser (Bu¹) Phe Ψ

- 5 (NHCO) GlyLeuArg (Boc₂, Me) Phe-Rink Amide MBHA resinを得た。うち 34 mg に TFA / PhSMe / m-cresol / TIS / EDT (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 200 μ L を加え 2 時間攪拌した。反応溶液にエーテルを加え沈殿を得、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗浄を行い、残渣を酢酸水溶液で抽出、濾過により樹脂を除いた後、YMC D-ODS-5-ST S-5
10 120A カラム (20 x 150mm) を用いた分取HPLCで、A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B: 76/24~66/34への直線型濃度勾配溶出 (60分) を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末0.7 mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1316.3 (計算値1316.7)

- 15 HPLC溶出時間: 18.7 分

溶出条件:

カラム: Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液: A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100/0~0/70へ。直線型濃度勾配溶出 (35分)。

- 20 流速: 1.0ml/分

実施例 12 (合成法 L): [N((CH₂)₃Gn) Gly₉]-MS10 (化合物番号 218) の製造

- Fmoc-Phe-Rink Amide MBHA resin 192 mg を用い ABI 433A により
25 ペプチド鎖を伸長し、Fmoc-GlyPhe-Rink Amide MBHA resin を得た。うち 1/4 量を脱 Fmoc

し、DMF 2 mL、AcOH 50 μ L、Boc- β -Ala-H 5 mg、NaBH₃CN 16 mg を加え、30 分間振盪した。樹脂を洗浄後 Fmoc-Leu 71 mg、CIP 56 mg、HOAt 27 mg、DIEA 105 mL を加え 15 時間振盪した。樹脂を洗浄後

ABI 433A を用いペプチド鎖を伸長し、Z-Tyr (Bzl) Asn (Trt) Trp (Boc) Asn (Trt) Ser (Bu^t) PheGlyLeuN((CH₂)₃NHBoc) GlyPhe-Rink Amide MBHA resin を得た。これに TFA / PhOH / H₂O / TIS / EDT (87.5 / 5 / 2.5 / 2.5 / 2.5) 1 mL を加え 2 時間攪拌した。

5 樹脂をろ去後濃縮し、エーテルを加え沈殿とした後、半量を DMF 500 μ L に溶解し、1H-pyrazole-1-carboxamide hydrochloride 9 mg、DIEA 22 mL を加え、15 時間攪拌した。溶媒を留去後エーテルを加え沈殿とし、氷冷下 PhSMe 60 μ L、m-cresol 56 μ L、EDT 26 μ L、TFA 337 μ L、TMSBr 65 μ L を加え 2 時間攪拌した。溶媒を留去後エーテルを加え沈殿を得、遠心分離後、上清を除く操作を繰り返し洗浄を行い、残渣を酢酸水溶液で抽出、濾過により樹脂を除いた後、YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム (20 x 150mm) を用いた分取HPLCで、A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B：74/26～64/36への直線型濃度勾配溶出 (60分) を行い、目的物を含む分画を集め

10 凍結乾燥し白色粉末1.8mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1302.5 (計算値1302.7)

HPLC溶出時間：18.6分

溶出条件：

カラム：Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)

20 溶離液：A液：0.1%TFA-水、B液：0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B：100/0～30/70へ。直線型濃度勾配溶出 (35分)。

流速：1.0ml/分

実施例 13 (合成法M)：MS10 (化合物番号3) の製造

25 市販p-メチルBHA樹脂 (0.77 mmole/g resin) をペプチド合成機 ABI 430Aの反応曹に入れ、Boc-Strategy (DCC-HOBt) ペプチド合成方法でBoc-Phe. Boc-Arg (Tos), Boc-Leu. Boc-Gly, Boc-Phe. Boc-Ser (Bzl)), Boc-Asn. Boc-Trp (For), Boc-Asn. Boc-Tyr (Br-Z) を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得た。この樹脂0.

11gをp-クレゾール1ml、1, 4-ブタンジチオール1. 2 mlと共に無水
 弗化水素10 ml中、0℃、60分攪拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留
 物へジエチルエーテルを加え沈殿を濾過した。この沈殿に50%酢酸水を
 加え抽出し、不溶部分を除き、抽出液を十分に濃縮後、50%酢酸水で充
 5 填したセファデックス（商品名）G-25カラム（2.0 x 80cm）に付し、
 同溶媒で展開、主要画分を集め凍結乾燥し、白色粉末40mgを得た。半量
 をLiChroprep（商品名）RP-18を充填したクロマトカラム（2.6 x 60cm
 ）に付け0. 1% TFA水 200mlで洗浄、0. 1% TFA水 300mlと0. 1% TFA含
 有33%アセトニトリル水 300mlを用いた線型勾配溶出を行い、主要画
 10 分を集め凍結乾燥し目的とするペプチド2. 2mgを得た。

質量分析による（M+H）1302. 5（計算値1302. 6）

HPLC溶出時間：18. 7分

溶出条件：

カラム：Wakosil-II 5C18T 4. 6 x 100mm

15 溶離液：A液：0. 1% TFA水、B液：0. 1% TFA含有アセトニトリルを用い
 A/B：95/5～45/55へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速：1. 0 ml／分

実施例1～11と同様にして合成した化合物の構造と物理化学的性質
 20 を以下の表1～表11に示す。

[表1]

化合物 番号		M+H+ (obs.)	M+H+ (cal.)	HPLC (min.)	HPLC 様式	合成法
1	Metastin	5858.35	5858.51	18.1	d	N
2	Lys-Asp- Leu-Pro- Asn-MS10	1869.6	1869.9	18.6	d	N
3	MS10	1302.5	1302.6	18.7	d	N
4	des(1)-MS10	1139.6	1139.6	18.1	d	N
17	[Pya(4)10]MS 10	1303.6	1303.6	14.7	d	N

18	[Tyr(Me)10]MS10	1332.7	1332.7	17.7	d	N
19	[Phe(2F)10]MS10	1320.5	1320.6	17.8	d	N
23	[Tyr5]MS10	1378.6	1378.8	18.6	d	N
24	[Leu5]MS10	1328.7	1328.7	19.8	d	N
30	Acetyl-MS10	1344.5	1344.6	29.2	b	A
31	Fmoc-MS10	1524.6	1524.7	23.1	b	A
38	[D-Ser5]MS10	1302.5	1302.6	11.8	c	A
39	[D-Asn4]MS10	1302.5	1302.6	11.6	c	A
40	[D-Trp3]MS10	1302.5	1302.6	11.5	c	A
41	[D-Asn2]MS10	1302.5	1302.6	11.7	c	A
42	[D-Tyr1]MS10	1302.5	1302.6	11.4	c	A
44	[Lys9]MS10	1274.6	1274.6	11.7	c	A
45	[Ala8]MS10	1260.5	1260.6	10	c	A
50	[Ala7]MS10	1316.3	1316.7	12.2	c	A
51	[NMePhe10]MS10	1316.3	1316.7	22.7	a	A
53	des(1-3)-Fmoc-MS10	1061.2	1061.5	27.3	a	A
54	des(1-2)-Fmoc-MS10	1247.4	1247.6	29.6	a	A
55	des(1)-Fmoc-MS10	1361.6	1361.6	28.2	a	A
56	[Lys2]MS10	1316.6	1316.7	16.8	d	N
57	[Asp2]MS10	1303.7	1303.6	17.7	d	N
58	[Tyr2]MS10	1351.7	1351.7	18.2	d	N
59	[Leu2]MS10	1301.6	1301.7	19.2	d	N
60	[Pya(3)10]MS10	1303.6	1303.6	14.7	d	N
61	[Phe(4F)10]MS10	1320.6	1320.6	18.0	d	N
67	[Ala3]MS10	1187.4	1187.6	9.3	c	A
68	[Leu3]MS10	1229.6	1229.6	11.1	c	A
69	[Ser3]MS10	1203.5	1203.6	8.9	c	A

[表 2]

70	[Asp3]MS10	1231.6	1231.6	9	c	A
71	[Lys3]MS10	1244.6	1244.7	8.1	c	A
72	[Ala1]MS10	1210.5	1210.6	11.1	c	A
73	[Leu1]MS10	1252.6	1252.7	12.5	c	A
74	[Ser1]MS10	1226.6	1226.6	10.9	c	A
75	[Asp1]MS10	1254.4	1254.6	11	c	A
76	[Lys1]MS10	1267.6	1267.7	10	c	A
77	[Phe(4CN)10] MS10	1327.5	1327.6	17.2	d	N
78	[Trp(For)3, Phe(4CN)10] MS10	1355.6	1355.6	17.4	d	N
79	[Hph10]MS10	1316.5	1316.7	20.6	a	A
81	[NMeArg9]M S10	1316.3	1316.7	23.3	a	A
82	[Arg(Me)9]M S10	1316.5	1316.7	20.1	a	E
83	[Arg(asy Me2) 9]MS10	1330.4	1330.7	21.3	a	A
87	des(4-5)- Boc-MS10	1201.6	1201.6	22.5	d	A
88	des(4-5)- MS10	1101.5	1101.5	18.6	d	A
90	[9 ^ψ 10,CH2NH]M S10	1260.6	1260.7	19.8	a	D
91	[8 ^ψ 9,CH2NH]MS 10	1288.7	1288.7	20.5	a	D
97	[Har9]MS10	1316.3	1316.7	11.9	c	A
98	[Lys(Me2)9]M S10	1302.6	1302.7	11.8	c	A
101	[Ser7]MS10	1332.6	1332.6	11.6	c	A
105	[Nle8]MS10	1302.3	1302.6	11.9	c	A
107	[Val8]MS10	1288.5	1288.6	11	c	A
109	[Tyr10]MS10	1408.4	1408.7	10.2	c	A
110	[Nal(2)10]MS 10	1332.4	1332.6	13.5	c	A
111	[Phe(F5)10]M S10	1342.4	1342.7	13.5	c	A
112	[Cha10]MS10	1360.3	1360.6	13.4	c	A

114	des(1-3)-3-(3-Indolyl)propionyl-MS10	1010.5	1010.5	13.8	c	A+I
121	des(1-4)-[Trp5]MS10	824.3	824.5	22.5	d	N
123	[NMeLeu8]MS10	1316.7	1316.7	12.7	c	A
126	[NMeSer5]MS10	1317	1316.7	11.8	c	A
127	[D-Asn4,NMePhe6]MS10	1316.7	1316.7	11.8	c	A
128	[10Ψ,CSNH]MS10	1318.4	1318.6	21.8	a	C
129	[Arg(symMe2)9]MS10	1331.2	1330.7	20.9	a	A

[表 3]

130	[Phe(4Cl)10]MS10	1336.4	1336.6	13.1	c	A
131	[Phe(4NH2)10]MS10	1317.4	1317.6	8.3	c	A
132	[Phe(4NO2)10]MS10	1347.4	1347.6	12.2	c	A
133	[Nal(1)10]MS10	1352.6	1352.7	13.5	c	A
134	[Trp10]MS10	1341.5	1341.6	12	c	A
137	[Nle9]MS10	1259.4	1259.6	15.3	c	A
138	[Cit9]MS10	1303.4	1303.6	12.2	c	A
140	[Arg(Me)9,NMePhe10]MS10	1330.4	1330.7	21	a	E
141	[D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	1316.9	1316.7	20.2	a	E
142	[D-Tyr1,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	1316.7	1316.7	20.1	a	E
143	[D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	1316.7	1316.7	20.3	a	E

	9]MS10					
144	des(1-3)- Fmoc- [Arg(Me)9]M S10	1075.2	1075.5	26	a	E
145	des(1-2)- Fmoc- [Arg(Me)9]M S10	1261.2	1261.6	28.6	a	E
146	[10 Ψ,CSNH,D- Tyr1]MS10	1318.4	1318.6	21.4	a	C
150	[Tyr6]MS10	1318.4	1318.6	10.2	c	A
151	[Nal(1)6]MS1 0	1352.6	1352.7	13.5	c	A
152	[Nal(2)6]MS1 0	1352.6	1352.7	13.6	c	A
153	[Phe(F5)6]M S10	1392.5	1392.6	13.7	c	A
154	[Phe(4F)6]M S10	1320.8	1320.6	12.3	c	A
156	[Cha6]MS10	1308.2	1308.5	13.2	c	A
163	[6 Ψ 7,CH2NH]MS 10	1288.7	1288.7	18.2	a	D
165	[Dap(Gly)9]- MS10	1289.8	1289.6	19.2	a	E
166	[6 Ψ 7,CSNH]MS1 0	1318.7	1318.6	20.8	a	F
169	[D- Tyr1,Ala3,Arg (Me)9]MS10	1202.1	1201.6	9	c	E
170	[D- Tyr1,Ser3,Ar g(Me)9]MS10	1218.2	1217.6	8.8	c	E
171	[D- Tyr1,Cha3,Ar g(Me)9]MS10	1284.2	1283.7	12.1	c	E
172	[D- Tyr1,Cha6,Ar g(Me)9]MS10	1402.9	1322.7	13.1	c	E
173	[D-	1410.9	1330.7	12.2	c	E

	Tyr1,Ala7,Arg (Me)9]MS10					
174	[D- Tyr1,Arg(Me) 9,Trp10]MS1 0	1335.3	1335.7	11.7	c	E
176	[AzaGly7]MS 10	1303.3	1303.6	18.9	a	G
181	[D- Tyr1,Cha3,6, Arg(Me)9]MS 10	1370.6	1370.6	13.9	c	E
182	[D- Tyr1,Cha3,6, Arg(Me)9,Trp 10] MS10	1328.2	1328.7	21.3	a	E
183	[Phe(4NH2)9] MS10	1328.2	1308.6	19.4	a	A

[表 4]

184	[Phe(4-Guanidino)9]MS10	1350.4	1350.6	19.7	a	E
185	[Dap(GnGly)9]MS10	1331.2	1331.6	19.1	a	E
186	[Trp(For)10]MS10	1369.3	1369.6	19.6	a	B
187	[Abu8]MS10	1274.4	1274.6	10.4	c	A
189	[Ala(3-Bzt)10]MS10	1358.4	1358.6	13.4	c	A
190	[D-Tyr1,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1284.5	1284.7	19.3	a	H
191	[D-Tyr1,Ser3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1218.4	1218.6	15.9	a	H
192	[D-Tyr1,Arg(Et)9]MS10	1330.5	1330.7	18.9	a	E
193	[D-Tyr1,Arg(n-Pr)9]MS10	1344.8	1344.7	19.4	a	E
194	[D-Tyr1,Arg(Ac)9]MS10	1345.1	1344.6	18.8	a	E
197	[Phe(3F)10]MS10	1320.6	1320.6	12.2	c	A
198	[Phe(3,4F2)10]MS10	1338.7	1338.6	12.7	c	A
199	[Phe(3,4Cl2)10]MS10	1370.6	1370.6	13.1	c	A
200	[Phe(3CF3)10]MS10	1370.6	1370.6	13.1	c	A
201	[Ala(2-Qui)10]MS10	1353.4	1353.6	9.8	c	A
203	[D-Tyr1,Cha6,Arg(Me)9]MS10	1322.4	1322.7	12.9	c	E

204	[D-Tyr1, Ala7, Arg(Me)9]MS 10	1330.4	1330.7	11.7	C	E
205	[D- Tyr1,Thr3,Ar g(Me)9]MS10	1231.4	1231.6	9	C	E
206	[D- Tyr1,Ile3,Arg(Me)9]MS10	1243.6	1243.7	10.1	C	E
207	[D- Tyr1,Ser4,Ar g(Me)9]MS10	1289.5	1289.6	11.7	C	E
208	[D- Tyr1,Thr4,Ar g(Me)9]MS10	1303.4	1303.7	12	C	E
209	[D- Tyr1,Gln4,Arg (Me)9]MS10	1330.8	1330.7	11.6	C	E
210	[D- Tyr1,Ala4,Arg (Me)9]MS10	1273.7	1273.6	12.3	C	E
211	[D- Tyr1,Thr5,Ar g(Me)9]MS10	1330.7	1330.7	11.7	C	E
212	[D- Tyr1,Ala5,Arg (Me)9]MS10	1300.5	1300.7	12.1	C	E
213	[D- Tyr1,Val8,Arg (Me)9]MS10	1302.5	1302.6	10.4	C	E
214	[D- Tyr1,Gln2,Arg (Me)9]MS10	1330.5	1330.7	11.4	C	E
215	[D- Tyr1,Thr2,Ar g(Me)9]MS10	1303.4	1303.7	11.9	C	E
216	des(1)-[D- Asn2,Arg(Me) 9]MS10	1153.3	1153.6	11.1	C	E
217	des(1)-[D- Tyr2,Arg(Me) 9]MS10	1202.4	1202.6	12.3	C	E

217

218	[N((CH ₂) ₃ Gn) Gly9]MS10	1302.5	1302.7	18.6	a	M
220	[Arg(Et)9]MS 10	1330.7	1330.7	19.5	a	E

[表 5]

221	[D- Tyr1,Thr3,Az aGly7,Arg(Me) 9] MS10	1232.5	1232.6	16.1	a	H
222	des(1)-[D- Tyr2,AzaGly7 ,Arg(Me)9]MS 10	1203.5	1203.6	19.3	a	H
223	des(1-2)-[D- Trp3,Arg(Me) 9]MS10	1039.5	1039.5	11	c	E
224	des(1)-[D- Tyr2,D- Trp3,Arg(Me) 9]MS10	1202.4	1202.6	12.2	c	E
225	des(1)-[D- Asn2,D- Trp3,Arg(Me) 9]MS10	1153.6	1153.6	11.1	c	E
226	des(1)-[D- Tyr2,Ser3,Ar g(Me)9] MS10	1103.5	1103.6	9.5	c	E
227	des(1)-[D- Tyr2,Thr3,Ar g(Me)9] MS10	1117.3	1117.6	9.8	c	E
228	des(1)-[D- Tyr2,Ile3,Arg(Me)9]MS10	1129.6	1129.6	11.5	c	E
229	[D- Tyr1,Val3,Arg (Me)9]MS10	1229.5	1229.6	9.7	c	E
230	[D-Tyr1,D- Asn2,Arg(Me)	1316.5	1316.7	11.8	c	E

	9]MS10					
231	[D-Tyr1,D-Asn2,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	1316.3	1316.7	11.7	c	E
232	[D-Tyr1,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1317	1317.6	21	a	H
233	[D-Tyr1,Ile3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1244.1	1244.7	20.9	a	H
234	[D-Tyr1,Val3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1230.5	1230.6	20.6	a	H
235	[D-Tyr1,Ala3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1202.5	1202.6	20.5	a	H
236	[D-Tyr1,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1317.6	1317.6	20.9	a	H
237	[D-Tyr1,D-Asn2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1317.6	1317.6	20.9	a	H
238	[D-Tyr1,D-Asn2,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1317.6	1317.6	20.6	a	H
239	des(1)-[D-Tyr2,Ser3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1104.1	1104.6	19	a	H

[表 6]

240	des(1)-[D-Tyr2,Ile3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1130.1	1130.6	20.3	a	H
241	des(1)-[D-Tyr2,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1188	1118.6	20.3	a	H
242	des(1)-[D-Tyr2,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1202.9	1203.6	21.2	a	H
244	[D-Tyr1,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1278.6	1278.6	10.5	c	H
245	[D-Tyr1,Nal(1)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1328.5	1328.7	12.3	c	H
246	[D-Tyr1,Nal(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1328.7	1328.7	12.3	c	H
247	[D-Tyr1,Phe(2Cl)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1315.6	1312.6	11.3	c	H
248	[D-Tyr1,Phe(3Cl)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1312.5	1312.6	11.6	c	H
249	[D-Tyr1,Phe(4Cl)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1312.5	1312.6	11.7	c	H

250	[D-Tyr1,Phe(4NH2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1293.4	1293.6	7.8	c	H
251	[D-Tyr1,Pya(3)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1279.4	1279.6	7.8	c	H
252	[D-Tyr1,D-Ala3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1202.4	1202.6	8.5	c	H
253	[D-Tyr1,Pro3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1228.4	1228.6	8.6	c	H
254	des(1)-[D-Tyr2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1164.4	1164.6	11.8	c	H
255	des(1)-[D-Tyr2,Nal(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1214.5	1214.6	13.7	c	H
256	des(1)-[D-Pya(3)2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1149.3	1149.6	9.5	c	H

[表 7]

257	[D-Tyr1,D-Asn2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1278.5	1278.6	10.9	c	H
258	[D-Pya(3)1,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1302.3	1302.6	10.1	c	H
259	[D-Ala1,AzaGly7,	1225.5	1225.6	10.7	c	H

	Arg(Me)9]MS 10					
260	des(1-3)-3- (3- Indolyl)propio nyl- [AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1025.2	1025.5	13.7	c	I
261	[7 ^ψ 8,CH2NH]MS 10	1288.1	1288.7	17.2	a	D
265	des(1-3)- Indole-3- carbo n yl - [AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	997.3	997.5	12.6	c	I
266	des(1-3)- Indole-3- acetyl- [AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1011.3	1011.5	12.7	c	I
267	des(1-3)-4- (3- Indolyl)butyry l- [AzaGly7, Arg(Me)9]MS 10	1039.3	1039.5	14.4	c	I
268	des(1-3)- Diphenylacet yl-[AzaGly 7,Arg(Me)9]M S10	1048.5	1048.5	15.7	c	I
269	des(1-3)-3- Phenylpropio nyl- [AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	986.7	986.5	13.5	c	I
270	[D-Tyr1Phe3, Ser-Phe5, AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1425.5	1425.7	13.4	c	H
271	des(1-2)-	1040.2	1040.5	10.4	c	H

	[AzaGly7,Arg (Me)9]MS 10					
272	des(1-2)- Acetyl- [AzaGly7, Arg(Me)9]MS 10	1082.3	1082.6	12.8	c	H
273	des(1-2)- Amidino- [AzaGly7, Arg(Me)9]MS 10	1082.3	1082.6	11.4	c	J
274	des(1-2)- Acetyl- [Ala3,AzaGly 7, Arg(Me)9]MS 10	967.3	967.5	9.6	c	H
275	des(1-2)- Acetyl- [Arg3,AzaGly 7, Arg(Me)9]MS 10	1052.2	1052.6	8.5	c	H
276	des(1-2)- Acetyl- [Thr3,AzaGly 7, Arg(Me)9]MS 10	997.2	997.5	9.4	c	H
277	des(1-3)-n- Hexanoyl- [AzaGly7, Arg(Me)9]MS 10	952.2	952.5	13.4	c	I

[表 8]

278	des(1-3)- Cyclohexane carbonyl- [AzaGly7, Arg(Me)9]MS	964.3	964.5	13.2	c	I
-----	---	-------	-------	------	---	---

	10					
279	des(1-3)-2-(Indol-3-yl)ethylcarbamoyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1040.2	1040.5	20.1	a	J
281	[D-Tyr1,Pya(2)6,Arg(Me)9]MS10	1317.3	1317.6	7.8	c	E
282	[D-Tyr1,Pya(4)6,Arg(Me)9]MS10	1317.2	1317.6	8	c	E
283	[D-Tyr1,D-Asn2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1284.3	1284.7	12.3	c	H
284	[D-Tyr1,D-Asn2,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1232.2	1232.6	8.6	c	H
285	[D-Tyr1,Pya(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1279.2	1279.6	7.9	c	H
286	[D-Tyr1,Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1279.2	1279.6	7.7	c	H
287	[D-Tyr1,D-Ser2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1290.1	1290.6	11.4	c	H
288	[D-Tyr1,D-His2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1340.2	1340.7	10.3	c	H

289	des(1)- [D- Pya(3)2,AzaG ly7,Arg(Me)9] MS10	1188.2	1188.6	10	c	H
290	[D- Pya(3)1,D- Asn2,Cha3,Az aGly7,Arg(Me)9]MS10	1269.5	1269.7	10.9	c	H
291	[D- Pya(3)1,D- Tyr2,Cha3,Az aGly7,Arg(Me)9]MS10	1317.4	1318.7	12	c	H
293	[4 Ψ 5,CH2NH]MS 10	1288.1	1288.7	18.4	a	D
294	[1 Ψ 2,CH2NH]MS 10	1288.4	1288.7	19.2	a	D
295	[2 Ψ 3,CH2NH]MS 10	1288.1	1288.7	18.2	a	D
296	[6 Ψ 7,CSNH,D- Tyr1,Arg(Me) 9] MS10	1332.1	1332.6	20.5	a	F
297	[D- Tyr1,Thr5,Az aGly7,Arg(Me)9] MS10	1331.2	1330.7	11.3	c	H
298	[D-Tyr1,D- Asn2,Thr5,Az aGly7,Arg(Me)9]MS10	1331.1	1330.7	11.6	c	H

[表 9]

299	[1 Ψ 2,CH2NH,Aza Gly7,Arg(Me) 9]	1303.4	1330.7	11.3	c	D+H
-----	---	--------	--------	------	---	-----

	MS10					
300	[1 Ψ 2,CH ₂ NH,D- Trp3,AzaGly7 ,Arg (Me)9]MS10	1303.4	1303.7	10.8	c	D+H
301	[D- Tyr1,Ala(2- Qui)3,AzaGly 7,Arg (Me)9]MS10	1329.4	1329.6	9	c	H
302	[D-Tyr1,D- Pya(4)3,AzaG ly7,Arg (Me)9]MS10	1279.4	1279.6	7.6	c	H
303	[D-Tyr1,D- Asn2,Pya(4)3, AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1279.4	1279.6	7.6	c	H
304	[D- Asn2,Pya(4)3, AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1279.4	1279.6	7.7	c	H
305	des(1)-[D- Tyr2,D- Pya(4)3,AzaG ly7,Arg(Me)9] MS10	1165.4	1165.6	8	c	H
306	[D- Pya(4)1,D- Asn2,Cha3,Az aGly7,Arg(Me)9]MS10	1269.5	1269.5	10.8	c	H
307	[7 Ψ 8,CH ₂ NH,D- Tyr1,Arg(Me) 9] MS10	1302.2	1302.7	17.9	a	D+E
308	[6 Ψ 7,CH ₂ NH,D- Tyr1,Arg(Me) 9] MS10	1302.3	1302.7	18.1	a	D+E

310	[Nar9]MS10	1288.8	1288.6	19.4	a	E
311	[Nar(Me)9]MS10	1302.3	1302.6	19.5	a	E
312	[Har(Me)9]MS10	1330.2	1330.7	19.5	a	E
313	[Dab9]MS10	1246.1	1246.6	19.3	a	A
314	[Orn9]MS10	1260.2	1260.6	19.3	a	A
315	des(1)-[D-Asn2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1121.3	1121.6	11.4	c	H
316	[D-Tyr1,D-Asn2,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9,Phe(4F)10]MS10	1250.5	1250.6	17	a	H
317	[D-Tyr1,D-Asn2,Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9,Phe(4F)10]MS10	1297.4	1297.6	16.4	a	H
318	[D-Tyr1,AzaGly7,Arg(Me)9,Phe(4F)10]MS10	1335.4	1335.6	19	a	H

[表 10]

319	[6 ^ψ 7,NHCO,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	1316.3	1316.7	18.7	a	K
322	des(1-3)-3-Pyridylpropionyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	987.4	987.5	8.09	c	I
323	des(1-3)-4-Imidazoleacetyl-[AzaGly7,Arg	962.5	962.5	7.87	c	I

	(Me)9]MS10					
324	des(1-3)-4-Piperidinecarbonyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	965.5	965.5	7.69	c	I
325	des(1-3)-1-Piperidineacetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	979.5	979.5	8.52	c	I
326	des(1-3)-1-Methylpiperidinio-1-acetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	993.4	993.6	8.71	c	I
327	des(1-3)-1-Pyridinioacetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	973.4	973.5	8.09	c	I
328	des(1-3)-D-Glucronyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1030.2	1030.5	7.46	c	I
375	H ₂ N(CH ₂) ₂ Gly-[D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	1416.4	1416.7	17.3	a	E
385	des(1)-[D-Tyr2,D-Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9,Trp10]MS10	1204.4	1204.6	8.3	c	H
386	des(1-3)-3-Pyridylpropionyl-[AzaGly7,Arg(Me)9,Trp10]MS10	1026.4	1026.2	8.5	c	I

387	Dap-[D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	1402.7	1402.7	17.0	a	E
397	MeNHCS-Sar-[D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	1461.2	1460.7	20.0	a	E
400	(S)-1-(Quinolin-8-yl-carbamoyl)-4-thiapentylcarbamoyl-[D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	1617.9	1617.7	21.7	a	E
	a:0-70% AcCN/35min, flow1ml/min, Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm)					
	b:0-70% AcCN/35min, flow1ml/min, YMC ODS AM-301 (4.6 x 100mm)					

[表 1 1]

	c:20-70% AcCN/25min, flow1ml/min, YMC ODS AM-301 (4.6 x 100mm) d:5-55% AcCN/25min, flow1ml/min, Wakosil-II 5C18 HG (4.6 x 100mm) 化合物番号 1					
--	--	--	--	--	--	--

	のみ M ⁺ 値を 示す。					
--	-----------------------------	--	--	--	--	--

製剤例 1 :

- (1) 化合物番号305 10.0mg
- (2) 乳糖 60.0mg
- 5 (3) コーンスターチ 35.0mg
- (4) ゼラチン 3.0mg
- (5) ステアリン酸マグネシウム 2.0mg

化合物番号305 10.0mgと乳糖60.0mg及びコーンスターチ35.0mgの混合物を10%ゼラチン水溶液0.03ml (ゼラチンとして3.0mg) を用い、1mmメッシュの篩
10 を通して顆粒化した後、40℃で乾燥し再び篩過する。かくして得られる顆粒をステアリン酸マグネシウム2.0mgと混合し、圧縮する。得られる中心錠を、蔗糖、二酸化チタン、タルク及びアラビアゴムの水懸液による糖衣でコーティングする。コーティングが施された錠剤をミツロウで艶出してコート錠を得る。

15 製剤例 2

- (1) 化合物番号305 10.0mg
- (2) 乳糖 70.0mg
- (3) コーンスターチ 50.0mg
- (4) 可溶性デンプン 7.0mg
- 20 (5) ステアリン酸マグネシウム 3.0mg

化合物305 10.0mgとステアリン酸マグネシウム3.0mgを可溶性デンプンの水溶液0.07ml (可溶性デンプンとして7.0mg) で顆粒化した後、乾燥し、乳糖70.0mg及びコーンスターチ50.0mgと混合する。混合物を圧縮して錠剤を得る。

25 製剤例 3

- (1) 化合物番号305 5.0mg
- (2) 食塩 20.0mg

(3) 蒸留水

全量2mlとする

化合物番号305 5.0mg及び食塩20.0mgを蒸留水に溶解させ、水を加えて全量2.0mlとする。溶液をろ過し、無菌条件下に2mlのアンプルに充填する。アンプルを滅菌した後、密封し注射用溶液を得る。

5

試験例1：hOT7T175レセプター結合活性測定

(1) Cy-5標識metastin(40-54)の作製

Metastinのアミノ酸配列の40番目から54番目のアミノ酸配列を有する合成ペプチドに、そのアミノ末端に位置するリジンの ϵ 位のアミノ基を介してCy-5を導入し、さらにカルボキシル末端をアミド化したものをアマシヤム バイオサイエンス社の有する合成技術により得た。この合成ペプチドを用いて結合阻害実験を行なった。配列：(Cy-5)-KDLPNYNWNSFGLRF-NH₂

15 (2) 試験化合物、Cy-5標識metastin(40-54)およびhOT7T175発現CHO細胞を用いた結合阻害実験

hOT7T175発現CHO細胞は10%透析血清を含むMEM- α 培地(核酸不含)で培養した。培地を除き、接着している細胞をPBSで洗浄した後、5mM EDTAを含むPBSを添加し、セルスクレーパーを用いて細胞をフラスコから剥がした。遠心操作の後、細胞を 1.11×10^5 cells/mlとなるように測定用バッファー(10mM HEPES pH7.4、140mM NaCl、2.5mM CaCl₂、3mM MgCl₂、0.5% BSA、0.01% NaN₃)に懸濁し、終濃度1nMのCy-5標識metastin(40-54)を加えた。96穴黒色クリアボトムプレート(アプライドバイオシステム社)の各wellに、総結合を調べるために1%ジメチルスルホキシドを含む測定用バッファーを10 μ L、非特異的結合を調べるために測定用バッファーで希釈した10 μ Mの非標識ペプチド(標識したものと同一アミノ酸配列)溶液を10 μ L、試験化合物の結合阻害活性を調べるために測定用バッファーで希釈した試験化合物を10 μ Lそれぞれ添加し、さらに細胞懸濁液を90 μ Lずつ分注した。1時間後、FMAT 8100 HTS system(アプライドバイオシステム社)で細胞に結合したCy-5標識

25

metastin (40-54) 量を測定した。特異的結合は、総結合から非特異的結合を減じた値である。試験化合物の結合阻害活性は、総結合から試験化合物を加えた場合の測定値を減じた値の特異的結合に対する比率で示される。試験化合物のレセプター結合活性を表 1 2 ～表 1 7 に示す。

5

[表 1 2]

化合物 番号		IC50(M)
1	Metastin	1.7E-07
3	MS10	6.5E-09
4	des(1)-MS10	2.6E-07
17	[Pya(4)10]MS10	6.6E-12
18	[Tyr(Me)10]MS10	7.7E-09
19	[Phe(2F)10]MS10	8.6E-09
23	[Tyr5]MS10	4.0E-07
24	[Leu5]MS10	8.3E-10
30	Acetyl-MS10	3.1E-08
31	Fmoc-MS10	9.3E-07
32	Leu-Pro-Asn-MS10	2.5E-08
39	[D-Asn4]MS10	8.3E-07
40	[D-Trp3]MS10	1.9E-08
41	[D-Asn2]MS10	2.1E-07
42	[D-Tyr1]MS10	5.7E-08
44	[Lys9]MS10	1.9E-07
50	[Ala7]MS10	1.9E-07
54	des(1-2)-Fmoc-MS10	4.5E-07
57	[Asp2]MS10	1.0E-07
58	[Tyr2]MS10	1.6E-08
59	[Leu2]MS10	3.4E-07
60	[Pya(3)10]MS10	1.7E-07
61	[Phe(4F)10]MS10	1.3E-08
67	[Ala3]MS10	2.7E-08
68	[Leu3]MS10	7.7E-09
69	[Ser3]MS10	8.3E-08
70	[Asp3]MS10	2.0E-07
71	[Lys3]MS10	6.6E-08
72	[Ala1]MS10	5.4E-07
73	[Leu1]MS10	2.2E-07
75	[Asp1]MS10	8.8E-07

[表 1 3]

77	[Phe(4CN)10]MS10	7.4E-09
78	[Trp(CHO)3, Phe(4CN)10]MS10	2.5E-08
82	[Arg(Me)9]MS10	4.1E-09
83	[Arg(Me2)asy9]MS10	2.5E-08
97	[Har9]MS10	3.7E-07
101	[Ser7]MS10	1.0E-07
105	[Nie8]MS10	8.8E-07
107	[Val8]MS10	1.2E-07
109	[Tyr10]MS10	2.3E-08
110	[Nal(2)10]MS10	2.4E-08
111	[Phe(F5)10]MS10	1.4E-07
112	[Cha10]MS10	3.7E-07
114	des(1-3)-3-(3-Indolyl)propionyl-MS10	5.5E-07
128	[10Ψ,CSNH]MS10	5.5E-08
129	[Arg(Me2)sy9]MS10	8.3E-08
130	[Phe(4Cl)10]MS10	4.2E-08
131	[Phe(4NH2)10]MS10	1.2E-07
132	[Phe(4NO2)10]MS10	9.3E-08
133	[Nal(1)10]MS10	3.3E-07
134	[Trp10]MS10	1.1E-07
141	[D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	5.1E-08
142	[D-Tyr1,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	2.6E-08
143	[D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	7.7E-09
145	des(1-2)-Fmoc-[Arg(Me)9]MS10	1.2E-07
146	[10Ψ,CSNH,D-Tyr1]MS10	3.7E-07
150	[Tyr6]MS10	3.2E-07
151	[Nal(1)6]MS10	3.0E-07
152	[Nal(2)6]MS10	1.8E-07
153	[Phe(F5)6]MS10	3.9E-07
154	[Phe(4F)6]MS10	6.0E-08
156	[Cha6]MS10	4.9E-08
163	[6Ψ7,CH2NH]MS10	2.5E-07
166	[6Ψ7,CSNH]MS10	9.4E-09
169	[D-Tyr1,Ala3,Arg(Me)9]MS10	1.6E-07
170	[D-Tyr1,Ser3,Arg(Me)9]MS10	2.6E-07

[表 1 4]

171	[D-Tyr1,Cha3,Arg(Me)9]MS10	1.1E-07
-----	----------------------------	---------

174	[D-Tyr1,Arg(Me)9,Trp10]MS10	4.2E-07
176	[AzaGly7]MS10	5.2E-08
181	[D-Tyr1,Cha3,6,Arg(Me)9]MS10	1.9E-08
182	[D-Tyr1,Cha3,6,Arg(Me)9,Trp10]MS10	9.8E-08
186	[Trp(CHO)10]MS10	4.6E-07
187	[Abu8]MS10	7.2E-07
189	[Ala(3-Bzt)10]MS10	2.3E-07
190	[D-Tyr1,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.2E-08
191	[D-Tyr1,Ser3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.0E-07
192	[D-Tyr1,Arg(Et)9]MS10	5.3E-07
193	[D-Tyr1,Arg(n-Pr)9]MS10	9.2E-07
194	[D-Tyr1,Arg(Ac)9]MS10	2.1E-07
197	[Phe(3F)10]MS10	1.7E-07
198	[Phe(3,4F2)10]MS10	1.7E-07
199	[Phe(3,4Cl2)10]MS10	4.7E-07
200	[Phe(3CF3)10]MS10	3.4E-07
201	[Ala(2-Qui)10]MS10	8.2E-07
203	[D-Tyr1,Cha6,Arg(Me)9]MS10	3.7E-08
204	[D-Tyr1,Ala7,Arg(Me)9]MS10	6.8E-07
205	[D-Tyr1,Thr3,Arg(Me)9]MS10	2.6E-07
206	[D-Tyr1,Ile3,Arg(Me)9]MS10	8.5E-08
208	[D-Tyr1,Thr4,Arg(Me)9]MS10	8.3E-07
210	[D-Tyr1,Ala4,Arg(Me)9]MS10	7.3E-07
211	[D-Tyr1,Thr5,Arg(Me)9]MS10	4.4E-08
212	[D-Tyr1,Ala5,Arg(Me)9]MS10	3.6E-08
213	[D-Tyr1,Val8,Arg(Me)9]MS10	1.9E-07
214	[D-Tyr1,Gln2,Arg(Me)9]MS10	3.9E-07
215	[D-Tyr1,Thr2,Arg(Me)9]MS10	2.5E-07
216	des(1)-[D-Asn2,Arg(Me)9]MS10	7.0E-07
217	des(1)-[D-Tyr2,Arg(Me)9]MS10	2.5E-07
220	[Arg(Et)9]MS10	3.3E-07
221	[D-Tyr1,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	9.5E-08
222	des(1)-[D-Tyr2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.3E-08
223	des(1-2)-[D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	7.6E-07

[表 1 5]

224	des(1)-[D-Tyr2,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	1.4E-07
225	des(1)-[D-Asn2,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	4.1E-07
226	des(1)-[D-Tyr2,Ser3,Arg(Me)9]MS10	1.0E-07
227	des(1)-[D-Tyr2,Thr3,Arg(Me)9]MS10	4.8E-08
228	des(1)-[D-Tyr2,Ile3,Arg(Me)9]MS10	4.0E-08

229	[D-Tyr1,Val3,Arg(Me)9]MS10	1.3E-07
230	[D-Tyr1,D-Asn2,Arg(Me)9]MS10	2.5E-07
231	[D-Tyr1,D-Asn2,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	5.5E-08
232	[D-Tyr1,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.9E-08
233	[D-Tyr1,Ile3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.3E-08
234	[D-Tyr1,Val3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.7E-08
235	[D-Tyr1,Ala3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.0E-07
236	[D-Tyr1,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.2E-08
237	[D-Tyr1,D-Asn2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.7E-08
238	[D-Tyr1,D-Asn2,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.9E-08
239	des(1)-[D-Tyr2,Ser3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.2E-07
240	des(1)-[D-Tyr2,Ile3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.7E-08
241	des(1)-[D-Tyr2,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.6E-08
242	des(1)-[D-Tyr2,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	7.0E-08
244	[D-Tyr1,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	7.7E-08
245	[D-Tyr1,Nal(1)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	9.8E-08
246	[D-Tyr1,Nal(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	7.1E-09
247	[D-Tyr1,Phe(2Cl)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.5E-08
248	[D-Tyr1,Phe(3Cl)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.8E-08
249	[D-Tyr1,Phe(4Cl)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.5E-07
250	[D-Tyr1,Phe(4NH2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.7E-09
251	[D-Tyr1,Pya(3)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	8.7E-08
252	[D-Tyr1,D-Ala3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.8E-07
253	[D-Tyr1,Pro3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.7E-08
254	des(1)-[D-Tyr2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.1E-08
255	des(1)-[D-Tyr2,Nal(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.3E-08
256	des(1)-[D-Pya(3)2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.2E-08
257	[D-Tyr1,D-Asn2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.0E-08
258	[D-Pya(3)1,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	9.0E-08
259	[D-Ala1,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.5E-07

[表 16]

260	des(1-3)-3-(3-Indolyl)propionyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.2E-07
261	[7ψ8,CH2NH]MS10	3.9E-07
265	des(1-3)-Indole-3-carboxyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	9.5E-08

266	des(1-3)-Indole-3-acetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.3E-07
267	des(1-3)-4-(3-Indolyl)butyryl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.6E-07
268	des(1-3)-Diphenylacetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.5E-07
269	des(1-3)-3-Phenylpropionyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.7E-07
270	Endo-Phe5a-[D-Tyr1,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.5E-08
271	des(1-2)-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.2E-07
272	des(1-2)-Acetyl-[AzaGly7, Arg(Me)9]MS10	5.4E-07
273	des(1-2)-Amidino-[AzaGly7, Arg(Me)9]MS10	3.0E-07
275	des(1-2)-Acetyl-[Arg3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.1E-07
276	des(1-2)-Acetyl-[Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.8E-07
277	des(1-3)-n-Hexanoyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.4E-08
278	des(1-3)-Cyclohexanecarbonyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.1E-07
279	des(1-3)-2-(Indol-3-yl)ethylcarbamoyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.9E-08
281	[D-Tyr1,Pya(2)6,Arg(Me)9]MS10	2.3E-07
283	[D-Tyr1,D-Asn2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	6.9E-10
284	[D-Tyr1,D-Asn2,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.4E-08
285	[D-Tyr1,Pya(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.0E-08
286	[D-Tyr1,Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.7E-08
287	[D-Tyr1,D-Ser2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.3E-09
288	[D-Tyr1,D-His2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	7.2E-11
289	[D-Pya(3)2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10-(2-10)	8.4E-09
290	[D-Pya(3)1,D-Asn2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.4E-09
291	[D-Pya(3)1,D-Tyr2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.1E-10
294	[1ψ2,CH2NH]MS10	3.0E-08
295	[2ψ3,CH2NH]MS10	6.8E-07
296	[6ψ7,CSNH,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	1.4E-08
297	[D-Tyr1,Thr5,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	9.3E-10
298	[D-Tyr1,D-Asn2,Thr5,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.5E-10
299	[1Ψ2,CH2NH,AzaGly7,Arg(Me)9]-MS10	1.2E-09
300	[1Ψ2,CH2NH,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]-MS10	3.8E-09
301	[D-Tyr1,Ala(2-Qui)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.5E-08

[表 17]

302	[D-Tyr1,D-Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	7.7E-09
303	[D-Tyr1,D-Asn2,Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.0E-10
304	[D-Asn2,Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.0E-09
305	des(1)-[D-Tyr2,D-Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.3E-09
306	[D-Pya(4)1,D-Asn2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.4E-09
307	[7Ψ8,CH2NH,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	6.4E-08
308	[6Ψ7,CH2NH,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	3.5E-07
310	[Nar9]MS10	3.1E-07
311	[Nar(Me)9]MS10	4.7E-07
312	[Har(Me)9]MS10	1.0E-07
313	[Dab9]MS10	6.9E-07
314	[Orn9]MS10	4.7E-07
316	[D-Tyr1,D-Asn2,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9,Phe(4F)10]MS10	2.6E-08
317	[D-Tyr1,D-Asn2,Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9,Phe(4F)10]MS10	2.1E-09
318	[D-Tyr1,AzaGly7,Arg(Me)9,Phe(4F)10]MS10	9.9E-10
319	[6Ψ7,NHCO,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	9.7E-09
322	des(1-3)-3-Pyridylpropionyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.4E-08
323	des(1-3)-4-Imidazoleacetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.8E-07
328	des(1-3)-D-Glucronyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.7E-07

試験例 2 : FLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定

特開2000-312590記載の方法でFLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定を実施した。

- 5 hOT7T175安定発現細胞株は動物細胞発現用プラスミドpAK-rOT175をCHO/dhfr⁻細胞にCellPfect Transfection kit (Amersham Pharmacia Biotech社)を用いて形質導入することにより取得した。まず、蒸留水240 μLに溶解したプラスミドDNA 9.6 μgに対してBuffer A (CellPfect Transfection kitに添付) 240 μLを添加し、攪拌し、10分
- 10 間静置後、Buffer B (CellPfect Transfection kitに添付) 480 μLを

添加し、激しく攪拌し該DNAを含有するリポソームを形成させた。 4×10^5 個のCHO/dhfr⁻細胞(ATCCより入手)を60 mmシャーレに播き、10%のウシ胎児血清(BIO WHITTAKER社)を含むHam's F-12培地(日水製薬株式会社)中で37℃、5%炭酸ガス中で2日間培養した後、該リポソーム

5 480mlをシャーレの該細胞上に滴下させた。これを、37℃、5%炭酸ガス中にて6時間培養した後、血清を含まないHam's F-12培地で2回細胞を洗浄し、シャーレの該細胞上に15%グリセロール3 mlを添加し2分間処理した。これを、再度、血清を含まないHam's F-12培地で2回洗浄した後、10%のウシ胎児血清を含むHam's F-12培地中で37℃、5%炭酸ガス

10 中で15時間培養した。該細胞をトリプシン処理により分散させてシャーレから回収し、 1.25×10^4 個ずつ6-well plateに播き、透析済み10%ウシ胎児血清(JRH BIOSCIENCES社)を含むDulbecco's modified Eagle medium(DMEM)培地(日水製薬株式会社)中にて37℃、5%炭酸ガス中にて培養を開始した。プラスミドの導入された形質転換CHO細胞は該培

15 地中で生育するが非導入細胞は次第に死滅していくので、培養開始1日目、および2日目に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始8-10日後に生育してきた形質転換CHO細胞のコロニーを約20個単離した。これらのコロニーの細胞からリガンドペプチドであるメタスチンに対して高い反応性を示す細胞(以後hOT7T175/CHOと略称する)を選別し、以降

20 の実験に用いた。

合成ペプチドについて、hOT7T175/CHOにおける細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定をFLIPR(Molecular Devices社)を用いて行った。

hOT7T175/CHOは10%透析処理済ウシ胎児血清(以後dFBSと略称する)を加えたDMEM(以下10%dFBS/DMEMとする)を用いて継代培養し、実験に

25 用いた。hOT7T175/CHOをそれぞれ 15×10^4 cells/mlとなるように10%dFBS-DMEMに懸濁し、FILPR用96穴プレート(Black Plate clear bottom、Coster社)へ、各ウェルあたり200 μ Lずつ蒔き(3.0×10^4 cells/200 μ L/ウェル)、37℃-5%CO₂インキュベーター中で一晚培養した(以後細胞プレートと略称する)。HANKS/HBSS(HANKS 9.8 g、炭酸水素ナトリウ

ム0.35 g、1M HEPES 20 ml、1N水酸化ナトリウムでpH 7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理)21 ml、250 mM Probenecid 210 μ l、ウシ胎児血清(FBS)210 μ l (HANKS/HBSS- Probenecid-FBS)を混合した。

また、Fluo3-AM2バイアル (50 μ g/バイアル) をジメチルスルフォキシ
 5 シド21 μ L、20% Pluronic acid 21 μ Lに溶解し、これを上記
 HANKS/HBSS- Probenecid-FBS 10 mlに加え、混和後、培養液を除いた細胞
 プレートに各ウェルあたり100 μ Lずつ分注し、37℃-5% CO₂インキュ
 ベーター中で1時間インキュベートした(色素ローディング)。ペプチ
 ドを 1×10^{-3} Mとなるようジメチルスルフォキシドに溶解した。このペプ
 10 チド溶液を2.5 mM Probenecid、0.2% BSA、0.1% CHAPSを含む
 HANKS/HBSS を用いて希釈し、FLIPR用96穴プレート(V-Bottomプレート
 、Coster社)へ移した(以後、サンプルプレートとする)。細胞プレ
 ートの色素ローディング終了後、HANKS/HBSSに2.5 mM Probenecidを加え
 た洗浄バッファーでプレートウォッシャーを用いて細胞プレートを4回
 15 洗浄し、洗浄後100 μ Lの洗浄バッファーを残した。この細胞プレートと
 サンプルプレートをFLIPRにセットし、FLIPR装置により自動的にサンプ
 ルプレートから0.05 mlのサンプルを細胞プレートへと移して、細胞の
 応答反応を促した。180秒間の細胞内カルシウムイオン濃度の変化を継
 時的に測定した。表18～表22に細胞内Caイオン濃度上昇活性
 20 [Metastin(1-54)に対する比活性で表示]を示す。

[表18]

化合物番号	比活性
Metastin(1-54)	1
Metastin(45-54)	10
17	5
18	1
19	2
24	1
30	10
31	2
32	10

40	30
41	10
42	30
45	1
50	30
53	1
54	5
55	5
56	1
74	1
75	1
76	1
78	10
79	1
87	1
88	1
97	10
98	1/2
101	10
105	1
109	20
110	20
111	3
112	2
114	3

[表 19]

128	10
130	10
131	3
132	10
133	3
134	30
141	10
142	2
143	3
144	1
146	10
151	1
152	5
154	5

156	2
163	1
166	5
169	2
170	1
171	10
172	1
173	1
174	10
176	5
182	5
187	1
189	10
190	10
192	1
193	001
194	1
187	10
198	10
199	3
200	10

[表 20]

201	1
203	10
204	5
205	10
206	10
207	1/2
208	1
209	1/2
210	1
211	10
212	10
213	2
214	10
215	10
216	1
217	20
220	5
222	5

224	2
224	1
224	1
224	1
228	5
229	1
230	10
231	1
232	3
233	1
234	1
235	1
236	2
237	3
238	1
241	1
242	2

[表 2 1]

244	1
245	1
246	2
247	1
248	2
249	1
250	1
254	1
255	1
256	1
257	3
258	2
259	1
260	5
261	1
265	3
266	2
267	2
268	1
269	3
270	1
271	1

272	2
273	5
274	1
277	2
278	2
279	5
281	1/2
284	1
286	2
287	2
288	1
289	1
290	1

[表 2 2]

291	2
294	10
295	1
296	3
297	1
298	5
299	5
300	5
301	1
302	2
303	5
304	3
305	5
306	2
307	1
308	2
310	3
311	1
312	3
314	1
315	1
316	1
317	1
318	5
319	3
322	1

323	1
375	2
385	10
386	7
387	1
397	5

試験例 3 : hOT7T175発現CHO細胞における細胞増殖阻害活性の測定

- hOT7T175発現CHO細胞（以後、hOT7T175とする）を10% dialyzed FBSを添加したDMEM（以後、10%dFBS/DMEMとする）を用いて培養し、以下のアッセイに用いた。hOT7T175をそれぞれ10,000 cells/mlとなるように10% dFBS/DMEMに懸濁し、96 well plateに各ウェルあたり100 μ Lずつ播き（1,000 cells/well）、37℃-5% CO₂インキュベーター中で一晚培養した。翌日培地を除き、0.5% BSAを添加した10% dFBS/DMEM（以後、0.5% BSA/10% dFBS/DMEMとする）を90 μ L加えた。続いて、各ウェルに0.5% BSA/10% dFBS/DMEMに溶解したメタスチンもしくはメタスチン誘導体溶液10 μ Lを加え、37℃-5% CO₂インキュベーター中で3日間培養した。Cell Counting Kit-8溶液（同仁化学研究所）を各ウェルに10 μ L加え、37℃-5% CO₂インキュベーター中で4時間培養し、450nmの吸光度を測定した。
- Metasti (1-54)、Metastin (45-54)、合成化合物の細胞増殖阻害活性を表 2 3 に示す。

[表 2 3]

化合物 番号	IC50 (M)
305	8.94E-09
232	9.67E-09
286	1.83E-08
303	4.12E-08
322	7.19E-08
141	8.70E-08
1-54	2.12E-07
45-54	8.51E-06

* 1-54はMetastin (1-54) を、45-54はMetastin (45-54) を示す。

試験例 4 : hOT7T175発現CHO細胞における遊走阻害活性の測定

hOT7T175発現CHO細胞（以後、hOT7T175とする）を10% dialyzed FBS
5 を添加したDMEM（以後、10% dFBS/DMEMとする）を用いて培養しアッセイに
用いた。また、24-well 6.5mm Transwell (pore size 8.0 μ m) (COSTAR
) は以下の方法によりフィブロネクチン処理を行いアッセイに用いた。
すなわち、Transwellの上下室に1 μ g/mlのウシフィブロネクチン（ヤガ
イ株式会社）0.5mlを加え、室温で10分間静置し、フィブロネクチン溶液
10 を除き、さらに風乾させた。hOT7T175をDMEMで3回洗った後、0.5% BSA
を添加したDMEM（以後、0.5% BSA/DMEMとする）に 2.5×10^6 cells/ml
となるように懸濁した。メタスチンもしくはメタスチン誘導体を 0.5%
BSA/DMEMで希釈した。Transwellの下室に20% FBSを添加した0.5%
BSA/DMEM（或いはnegative controlの場合には0.5% BSA/DMEM）を600 μ L
15 加え、上室に細胞懸濁液50 μ L、メタスチンもしくはメタスチン誘導体
希釈溶液（或いはpositive controlの場合には0.5% BSA/DMEM）を50 μ L
加えた。37℃-5% CO₂インキュベーター中で7時間培養した後、培養液を
のぞき、Phosphate-buffered salineで湿らせた綿棒でフィルター上面
をぬぐい、フィルター上面の細胞を全て除いた。ディフクイック（国際
20 試薬株式会社）でフィルターを固定、染色し、フィルター下面に遊走し
た細胞数を数えた。遊走阻害活性を図1に示す。

試験例 5 : 腫瘍増殖抑制活性評価

ヒト結腸癌由来細胞株SW620担癌マウスを用い、Metastin(1-54)（以
25 下、Metastinと標記する）および化合物（化合物番号305, 322）のin vivo
での腫瘍増殖抑制作用について評価した。

蒸留水（大塚蒸留水）に溶解した1 mMのMetastin、0.1 mMおよび1 mM
の化合物、およびvehicleとしての蒸留水をそれぞれ100 μ Lずつ充填し
たAlza 浸透圧ポンプ（0.25 μ L/hour, 14 days release, Model 1002）

をエーテル麻酔下でBALB/cAnN-nu(6週齢、雌、日本チャールズリバー)マウス背部の皮下に埋め込み14日間の持続投与を開始した。実験数は、Metastin投与群とvehicle投与群は $n=10$ 、化合物投与群はいずれも $n=11$ とした。翌日にヒト大腸癌由来細胞株SW620細胞(ATCC) 2×10^5 cells
5 を200 μ Lの0.15M NaClを含む20 mMリン酸緩衝液(pH 7.2)(PBS)に溶解し、上記のマウスの左脇腹に皮下投与した。細胞を投与した日を0日目として、細胞投与4日目より13日目まで1日または2日おきに腫瘍を電子ノギスで測定し、腫瘍体積を(短径)²x 長径/2で算出した。図2に示す様に、Metastin投与群(24 nmol/day/mouse x 14 days)は、投与6日目に
10 vehicle群に比較して有意な増殖抑制作用を示した。一方、化合物322投与群は、Metastinの1/10の投与量(2.4 nmol/day/mouse x 14 days)で投与6日目から8日目までvehicle群に比較して有意な腫瘍増殖抑制活性を示した。また、Metastinと同用量の化合物322投与群(24 nmol/day/mouse x 14 days)は、投与6日目から11日目までvehicle群に
15 比較して有意な腫瘍増殖抑制活性を示し、投与11日目ではMetastin投与群と比較しても有意な腫瘍増殖抑制活性を示した。以上の結果から、Metastinはin vivoにおいても腫瘍増殖抑制作用を示し、化合物322は、Metastinの10倍以上の腫瘍増殖抑制作用を有することが明らかとなった。

20 同様に化合物305についての結果を図3に示す。Metastin投与群(24 nmol/day/mouse x 14 days)は、投与5-7日目にvehicle群に比較して有意な増殖抑制作用を示した。一方、化合物305投与群は、Metastinの1/10の投与量(2.4 nmol/day/mouse x 14 days)で投与5日目から11日目までvehicle群に比較して有意な腫瘍増殖抑制活性を示した。また、
25 Metastinと同用量の化合物305投与群(24 nmol/day/mouse x 14 days)は、投与5日目から9日目までvehicle群に比較して有意な腫瘍増殖抑制活性を示し、化合物305もin vivoにおいてMetastinの10倍以上の腫瘍増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。

試験例 6 : メタスチンの血糖上昇作用

- メタスチンの末梢投与による血糖値に及ぼす影響を検討するため、自由行動下採血用の手術を行った。成熟Wistar系雄性ラット（手術時体重210～230 g）をペントバルビタール50 mg/kgの腹腔内投与にて麻酔した。
- 5 解剖用パッドの上に背位に固定し、左側の頸静脈を露出させた。ポリエチレンチューブSP35（内径0.5 mm、外径0.9 mm、夏目製作所）を約30 cmの長さに切り、200単位/mlのヘパリン含有生理食塩水で満たした後、頸静脈に約4.5 cm挿入し固定した。チューブのもう一端は背側の皮下を通して頸部（背側）より露出させた。
- 10 術後一晩待ってから、メタスチン投与前に用量1 mlのツベルクリン用注射筒と25ゲージ注射針（いずれもテルモ社）を用いて300 μ lの血液を採取した。血液凝固を防止するため、注射筒には予め3 mg/ml EDTAを含む300 KIU/ml aprotinin溶液を3 μ l入れておいた。大塚生理食塩水またはメタスチン（17, 80, 170 nmol）の1 mL生理食塩水溶解液をチューブより1 mL/Kgで静脈投与した。静脈投与の開始時点から0、5、15、30、
- 15 60分後に頸静脈より300 μ lずつ採血した。採血した血液は微量高速冷却遠心機（MR - 150、トミー精工）を用いて遠心（13,000 rpm、5分間）し、上清（血漿）を回収した。血中グルコース濃度は、フジドライケム3500（FUJIFILM社）を用いて測定した。図4に示すごとくメタスチン投与群は
- 20 対象群に比し、静脈投与5分後より用量依存的（17-170 nmol/kg）に有意な（ $p < 0.005$, $n=5$ ）血中グルコース濃度の上昇作用を示した。血中グルコース値は、メタスチン投与量の増加にしたがい、最大値の上昇とともに上昇時間の延長（最大30分）が認められた。

25 試験例 7 : メタスチンの膵グルカゴン分泌促進作用

メタスチンの血中グルコース濃度上昇作用についてそのメカニズムを検討するため、血中グルコース濃度に変動を与えるホルモンとして知られている血中グルカゴン、インスリン、コルチコステロン、甲状腺ホルモン（T3）濃度に対するメタスチンの影響について検討した。成熟Wistar

系雄性ラット（手術時体重260～3000 g）に対し自由行動下採血用の手術を行った。術後一晩待ってから、メタスチン投与前に用量1 mlのツベルクリン用注射筒と25ゲージ注射針（いずれもテルモ社）を用いて300 μ lの血液を採取した。血液凝固を防止するため、注射筒には予め3
5 mg/ml EDTAを含む300 KIU/ml aprotinin溶液を3 μ l入れておいた。大塚生理食塩水またはメタスチンの生理食塩水溶解液（80 nmol/mL）をチューブより1mL/Kgで静脈投与した。静脈投与の開始時点から1、3、5、15分後に頸静脈より300 μ lずつ採血した。採血した血液は微量高速冷却遠心機（MR-150、トミー精工）を用いて遠心（13,000 rpm、5分間）し、上清（
10 血漿）を回収した。血中グルカゴン濃度はグルカゴンキット「第一」（第一ラジオアイソトープ研究所）、血中インスリン濃度はラットインスリン [125I]、アッセイシステム（Amersham Biosciences）、血中コルチコステロン濃度はラットコルチコステロン [125I]、アッセイシステム（Amersham Biosciences）、血中甲状腺ホルモン（T3）濃度はT-3・リア
15 ビーズ（ダイナボット（株））、血中グルコース濃度はフジドライケム3500（FUJIFILM社）を用いて測定した。図5に示すごとくメタスチン投与群は対象群に比し、投与1分後で有意な血中グルカゴン濃度の上昇が認められ、投与5分後まで有意な上昇は持続した。一方、血中インスリン濃度（図6）、血中コルチコステロン濃度（図7）および血中甲状腺ホル
20 モン（T3）濃度（図8）はメタスチン投与による変動は認められなかった。これらの結果およびメタスチン投与群では、血中グルカゴン濃度の上昇の後に血中グルコース濃度の上昇（図9）が見られることから、メタスチン静脈投与による血中グルコース濃度の上昇作用は、メタスチンによるグルカゴン分泌刺激によって引き起こされるものと考えられた。

25

試験例8 メタスチン誘導体の血糖上昇作用

メタスチン誘導体KiSS305（化合物305）およびKiSS322（化合物322）の血中グルコース濃度および血中グルカゴン濃度に及ぼす影響について検討した。成熟Wistar系雄性ラット（手術時体重260～3000 g）

に対し実験例1と同様に自由行動下採血用の手術を行った。術後一晩待ってから、メタスチン投与前に用量1 mlのツベルクリン用注射筒と25ゲージ注射針（いずれもテルモ社）を用いて300 μ lの血液を採取した。血液凝固を防止するため、注射筒には予め3 mg/ml EDTAを含む300 KIU/ml aprotinin溶液を3 μ l入れておいた。大塚生理食塩水またはメタスチンの生理食塩水溶解液(80 nmol/mL)をチューブより1mL/Kgで静脈投与した。静脈投与の開始時点から2、5、15、30、45、60分後に頸静脈より300 μ lずつ採血した。採血した血液は微量高速冷却遠心機(MR-150、トミー精工)を用いて遠心(13,000 rpm、5分間)し、上清(血漿)を回収した。実験例1または2と同様に、血中グルコース濃度はフジドライケム3500(FUJIFILM社)、血中グルカゴン濃度はグルカゴンキット「第一」(第一ラジオアイソトープ研究所)を用いて測定した。図10に示すごとく両化合物とも血中グルコース濃度の上昇が見られた。また、図11に示すごとく両化合物とも血中グルカゴン濃度の上昇が見られた。

15

試験例9 ヒトメタスチンを用いた未成熟ラットでの排卵誘発

equine chorionic gonadotropin (eCG、セロトロピン、大日本製薬)を100 IU/mLで生理食塩水(大塚製薬)に溶解し、生後23日齢の雌性Wistarラット(日本チャールズリバー)の背部皮下に、1個体当たり10 IUのeCGを、午前9時30分から10時の間に、容量1mLのツベルクリン用注射筒と26ゲージ注射針(いずれもテルモ)を用いて投与した。eCG投与後47~48時間後に以下に示す群分けを行い、それぞれの薬剤投与を行った。

グループA(ラット5匹): human chorionic gonadotropin (hCG、ゴナトロピン、大日本製薬)を100 IU/mLで生理食塩水に溶解し、1個体当たり20 IUを背部皮下に投与した。

グループB(ラット5匹): ヒトメタスチンを100nmol/mLで生理食塩水に溶解し、1個体当たり20nmolを背部皮下に皮下投与した。

グループC(ラット5匹): ヒトメタスチンを33.3nmol/mLで生理食塩

水に溶解し、1個体当たり6.67nmolを背部皮下に投与した。

グループD（ラット6匹）：1個体当たり200 μ Lの生理食塩水を背部皮下に投与した。

上記の薬剤の投与後、さらに24～25時間後に断頭し、血液、両側卵管
 5 および子宮を回収した。血液回収に際しては、血液凝固を防止するために、回収する遠心チューブにはあらかじめ3mg/mL EDTAを含む10KIU/mLのアプロチニン溶液（トラジロール、パイエル）を90 μ L入れておいた。血液回収後は、よく混和し、2,000Gで25分間遠心し、上清を回収して血漿サンプルとした。

10 排卵数の計数は、次のようにして行った。

実体顕微鏡下での卵管の観察により、卵管膨大部における卵の滞留が確認された場合には、同部位を27ゲージの注射針（テルモ）によって切開して卵を取り出し、トリプシン処理によって卵を取り囲む顆粒膜細胞を除去した後、卵を計数した。実体顕微鏡下での卵管の観察で、卵管膨
 15 大部での卵が確認できなかった場合には、先端を研磨した27ゲージの注射針を卵管口に挿入し、卵管および子宮内を400 μ L以上の生理食塩水で洗浄した後、流出液中の卵の有無を観察した。

得られた排卵数を表24に示す。

20 [表24]

	グループ A	グループB	グループC	グループD
1	36	29	29	0
2	35	56	39	0
3	40	17	32	0
4	42	25	22	0
5	35	32	16	0
平均排卵 数	37.6	31.8	27.6	0.00
標準偏差	3.21	14.65	8.91	0.00

表中、1～5はラットの個体番号を示す。

汎用の過排卵処理群であるグループAでは、ラット1匹あたり平均37.6個の排卵が確認された。メタスチンを投与したグループB、グループCでは、それぞれ平均31.8個、27.6個の排卵が確認された。一方、生理食塩水を投与したグループDでは、排卵数の平均は0.6個であり、排卵刺激非存在下での自発的排卵はほとんどなかった。

表22に示すラットから採取した血漿中に含まれるエストラジオール濃度を、ラジオイムノアッセイ（DPC・エストラジオールキット；Diagnostic Products Corporation）により測定した結果を図12に示す。

これより、グループA、グループBおよびグループC間で、血漿中に含まれるエストラジオールの濃度差は無く、生理食塩水を投与したグループDでのみ、エストラジオールの濃度が非常に高かったことがわかる。

血漿中に含まれるプロゲステロン濃度を、ラジオイムノアッセイ（DPC・プロゲステロン；Diagnostic Products Corporation）により測定した結果を図13に示す。

これより、プロゲステロン濃度はグループAが最も高く、グループBおよびグループCは、グループAの約半分の血中濃度であったことが、また、グループDのプロゲステロン濃度は非常に低かったことがわかる。

一般に、ラット、マウスおよびヒトの卵巣において産生される主なステロイドホルモンは、卵胞の成熟期ではエストロゲンであり、一方、排卵を誘発された後はプロゲステロンである。実際、図12および図13の結果でも、生理食塩水を投与したグループDでは、排卵が誘発されていないためにエストロゲン産生が高い状態にあり、一方hCGを投与したグループAでは、エストロゲン産生が低下し、プロゲステロンの産生が上昇していることがわかる。メタスチン投与群であるグループBおよび

グループCでは、血漿中エストロゲン濃度は非常に低く、逆にプロゲステロン濃度が上昇していることから、メタスチンはラット卵巣に対して、正常な過程を経て排卵を誘発していることがわかる。また、グループAよりもグループB、グループCのプロゲステロン濃度が低いことから、hCGと比べてメタスチンは、より穏やかな卵巣刺激作用を有していると考えられる。

試験例10 ヒトメタスチンの未成熟ラットでのゴナドトロピン放出作用

10 生後25日齢の雌性Wistarラット（日本チャールズリバー）に対し、午前9時から10時の間に、生理食塩水に33.3 nmol/mLの濃度で溶解したヒトメタスチンを、1個体当たり200 μ L、すなわちヒトメタスチン6.67nmolを背部皮下に投与した。メタスチンを投与する前、および投与してから1、2、4時間後に断頭し、血液を回収した。血液回収に際しては、血液凝固を防止するために、回収する遠心チューブにはあらかじめ3 mg/mLのEDTAを含む10 KIU/mLのアプロチニン溶液（トラジロール、バイエル）を90 μ L入れておいた。また回収後は、よく混和した後、2,000Gで25分間遠心し、上清を回収して血漿サンプルとした。血漿中に含まれるFSH（卵胞刺激ホルモン）、LH（黄体刺激ホルモン）、およびプロゲステロン濃度は、ラジオイムノアッセイ（Rat Follicle Stimulating Hormone (rFSH) [125 I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation、Rat Luteinizing Hormone (rLH) [125 I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation、いずれもアマシャムバイオサイエンス、およびDPC・プロゲステロン、Diagnostic Products Corporation）を用いて測定した。

メタスチン投与による未成熟ラット血中FSH濃度の変動を測定した結果を、図14に示す。メタスチン投与後1時間から、血中FSH濃度は有意に上昇を始め、2時間後で最も高くなっていた。4時間後では血中FSH濃度の低下が認められたが、投与前に比べると高い状態を維持していた。

メタスチン投与による未成熟ラット血中LH濃度の変動を測定した結果を、図15に示す。FSHの場合と同様に、メタスチン投与後1時間から、血中LH濃度は有意に上昇を始め、2時間後で最も高くなっていた。4時間後では血中LH濃度の低下が認められたが、投与前に比べると、高い状態を維持していた。

メタスチン投与による未成熟ラット血中プロゲステロン濃度の変動を測定した結果を、図16に示す。血中LH濃度の上昇を反映して、血中プロゲステロン濃度はメタスチン投与後1時間から穏やかな上昇を始め、2時間後は投与前に比べて有意に高い値を示した。

図14および図15の結果より、メタスチンを末梢投与すると、FSH、LHなどのゴナドトロピンの放出が誘導されることがわかる。試験例9で示したメタスチンによる排卵誘発は、このゴナドトロピン放出、特にLHの放出を介したものであると推察される。

なお、試験例9で示した排卵誘発作用はeCGを投与したラットでの作用であるが、本実施例の作用は未処置のラットを用いた結果であり、メタスチンによるゴナドトロピン放出作用にはeCGの前処理は必要としない。

図16の結果は、メタスチンの投与によるゴナドトロピンの放出が、卵巢にも生理的な刺激を与え、プロゲステロンの産生を亢進することを意味している。

試験例11 ヒトメタスチンによる成熟雄性ラットのゴナドトロピン放出作用

生後11週齢の雄性Wistarラット（日本チャールズリバー）に対し、午前10時30分から11時30分の間に、生理食塩水に175 nmol/mLの濃度で溶解したヒトメタスチンを、1個体当たり200 μ L、すなわちヒトメタスチン35 nmolを背部皮下に投与した。メタスチンを投与する前、および投与してから1、2、4時間後に断頭し、血液を回収した。血液回収に際しては、血液凝固を防止するために、回収する遠心チューブにはあらかじめ

め3 mg/mLのEDTAを含む10 KIU/mLのアプロチニン溶液（トラジロール、バイエル）を300 μ L入れておいた。また回収後は、よく混和した後、2,000Gで25分間遠心し、上清を回収して血漿サンプルとした。血漿中に含まれるFSH（卵胞刺激ホルモン）、LH（黄体刺激ホルモン）、および
5 テストステロン濃度は、ラジオイムノアッセイ（Rat Follicle Stimulating Hormone (rFSH) [125 I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation、Rat Luteinizing Hormone (rLH) [125 I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation、いずれもアマシャムバイオサイエンス、およびDPC・トータルテストステロン キット、
10 Diagnostic Products Corporation）を用いて測定した。

メタスチン投与によるラット血中FSH濃度の変動を測定した結果を、図17に示す。メタスチン投与後1時間から、血中FSH濃度は有意に上昇を始め、2時間後で最も高く、4時間後でも高い状態を維持していた。

メタスチン投与によるラット血中LH濃度の変動を測定した結果を、図
15 18に示す。FSHの場合と同様に、メタスチン投与後1時間から、血中LH濃度は有意に上昇を始め、2時間後で最も高くなっていた。4時間後では血中LH濃度の低下が認められたが、投与前に比べると、高い状態を維持していた。

メタスチン投与によるラット血中テストステロン濃度の変動を測定した結果を、図19に示す。血中テストステロン濃度はメタスチン投与後
20 1時間に急激な上昇を示し、2時間後、4時間後では低下が認められたが、投与前に比べるといずれの時点でも有意に高い値を示した。

図17および図18の結果より、メタスチンを末梢投与すると、雄性ラットにおいてFSH、LHなどのゴナドトロピンの放出が誘導されることがわかる。試験例9の結果を考慮すると、メタスチンはゴナドトロピンの
25 放出を促す上で、雌雄いずれにおいても非常に重要な因子であると考えられる。

図19の結果は、メタスチンの投与によるゴナドトロピンの放出が、精巣にも生理的な刺激を与え、テストステロンの産生を亢進することを

意味している。

これらの結果から、メタスチンの投与は、ゴナドトロピンの放出を介して精巣を刺激すると考えられる。メタスチンは、精子の成熟やホルモンの分泌など、男性生殖機能にも影響を及ぼしうることが示唆された。

5

試験例 1 2 化合物の血中安定性試験

マウス血清は、8週齢Balb/cマウス（ ）から採血後、37℃、30分放置し、13000 rpmにて10分間遠心分離した上清として取得し、得られた血清は-80℃にて凍結保存した。

10 安定性試験は血清45 μ Lに、化合物5nmol(5 μ L水溶液)を加え、37℃にて放置することで行った。放置時間は2、10、30分間の3点とした。放置後のサンプルは3分間煮沸後氷浴で冷却し、アセトニトリル/水（3/1）200 μ Lを加え、5分間超音波処理後5000rpmにて1分間遠心分離した。上清150 μ Lを蒸留水250 μ Lで希釈後不溶物を孔径0.45 μ mのフィルターでろ去し、ろ液200 μ LをHPLC 分析（220 nm）して化合物のピーク面積を求めた。同様の条件下、0分間処理時の面積との比を、それぞれ4回ずつ行った平均値の比率として計算し、残存率を求めた。次いで得られた残存率を縦軸に、時間を横軸としてグラフを作成後指数近似し、残存率が50%になる時間を半減期として算出した。

20 分析用HPLCは島津製作所製LC-VP seriesを用い、カラムは和光純薬製Wakosil-II 5C18 HG（4.6mm \times 100mm）を使用した。溶離液にはA液（0.1%TFA含有水）、B液（0.1%TFA含有アセトニトリル）を用い、流速1.0ml/分にてA/B：100/0 - 0/50の直線型濃度勾配溶出（25分）により分析を行った。

25 試験実施化合物とその $t_{1/2}$ （min）の値を表 2 5 に示す。

[表 2 5]

化合物番号	$t_{1/2}$ (min)
-------	-----------------

1	22.5
3	0.6
42	0.7
82	1.8
134	2.4
141	8.7
232	28.2
286	57.5
296	47.2
305	66.6
308	13.2
319	33.0
322	94.2

試験例 13 メタスチン誘導体を用いた未成熟ラットでの排卵誘発

equine chorionic gonadotropin (e
 5 CG、セロトロピン、大日本製薬) を 100 IU/mL で生理食塩水
 (大塚製薬) に溶解し、生後 23 日齢の雌性 Wistar ラット (日本チャ
 ールズリバー) の背部皮下に、1 個体当たり 10 IU の eCG を、午前
 9 時から 10 時の間に、容量 1 mL のツベルクリン用注射筒と 26 ゲー
 ジ注射針 (いずれもテルモ) を用いて投与した。eCG 投与後 47-4
 10 8 時間後に以下に示す群分けを行い、それぞれの薬剤投与を行った。

グループ A (5 匹) : human chorionic gonad
 o t r o p i n (hCG、ゴナトロピン、大日本製薬) を 100 IU
 /mL で生理食塩水に溶解し、1 個体当たり 20 IU を背部皮下に投与。

グループ B (5 匹) : 化合物番号 305 を 33.3 nmol/mL で
 15 生理食塩水に溶解し、1 個体当たり 6.7 nmol を背部皮下に皮下投
 与。

グループ C (5 匹) : 化合物番号 305 を 10.0 nmol/mL で
 生理食塩水に溶解し、1 個体当たり 2.0 nmol を背部皮下に投与。

グループ D (5 匹) : 化合物番号 322 を 33.3 nmol/mL で
 20 生理食塩水に溶解し、1 個体当たり 6.7 nmol を背部皮下に投与。

グループE（5匹）：化合物番号322を10.0nmol/mLで生理食塩水に溶解し、1個体当たり2.0nmolを背部皮下に投与。

グループF（6匹）：1個体当たり200μLの生理食塩水を背部皮下に投与。

- 5 これら薬剤の投与後さらに24-25時間後に断頭の後、血液、両側卵管および子宮を回収した。血液回収に際しては、血液凝固を防止するために、回収する遠心チューブにはあらかじめ3mg/mLのEDTAを含む10kIU/mLのアプロチニン溶液（トラジロール、バイエル）を90μL入れておき、また回収後は、よく混和したのち、2,000Gで25分間遠心し、上清を回収して血漿サンプルとした。

- 排卵数の計数は、Eur. J. Endocrinol. 138, 594-600（1998）に記載の方法を参考にして行った。すなわち、実体顕微鏡下での卵管の観察により、卵管膨大部における卵の滞留が確認された場合には、同部位を27ゲージの注射針（テルモ）によって切開して卵を取り出し、トリプシン処理によって卵を取り囲む顆粒膜細胞を除去した後、卵を計数した。実体顕微鏡下での卵管の観察で、卵管膨大部での卵が確認できなかった場合には、先端を研磨した27ゲージの注射針を卵管口に挿入し、卵管および子宮内を400μL以上の生理食塩水で洗浄した後、流出液中の卵の有無を観察した。

- 20 こうして得られた排卵数を図20に示す。汎用の過排卵処理群であるグループAでは、ラット1匹あたり平均38.0個の排卵が確認され、グループB、C、Dでの平均排卵数はそれぞれ32.6個、29.4個、29.6個であり、グループAと同等の排卵を示した。一方、化合物番号322を2.0nmol投与したグループEでは、排卵したラットは25 5匹中3匹であり、また平均排卵数も11.6個と、グループAと比較して少なかった。また陰性対象群であるグループFでは、全く排卵はみられなかった。

図20の結果から、hCGと同等の排卵を誘発するためには、化合物番号305は2.0nmol/個体以上、化合物番号322は6.7n

mo l / 個体以上を投与しなければならないことが判明した。

血漿中に含まれるエストラジオール濃度を測定した結果を図 2 1 に示す。血中エストラジオール濃度は、ラジオイムノアッセイ (D P C ・ エストラジオール キット、ヤトロン) により測定した。図 2 1 に示すように、エストラジオールに関しては、グループ A、B、C および D の間で差は無く、生理食塩水を投与したグループ F でのみ高値を示した。またグループ E では、排卵が誘発されなかったラットで高値を示す傾向にあった。

血漿中に含まれるプロゲステロン濃度を測定した結果を図 2 2 に示す。血中プロゲステロン濃度は、ラジオイムノアッセイ (D P C : プロゲステロン、ヤトロン) によって測定した。図 2 2 に示すように、血中プロゲステロンの値はグループ A で最も高く、グループ B、C、および D ではグループ A の半分弱の値を示した。またグループ E とグループ F は非常に低い値を示した。

図 2 1 および図 2 2 の結果から、化合物番号 3 0 5 では 2 . 0 n m o l / 個体以上、化合物番号 3 2 2 では 6 . 7 n m o l / 個体を投与することによって、エストロゲン産生細胞である顆粒膜細胞から、プロゲステロン産生細胞である黄体細胞への正常な分化が誘導されていることが判明した。また h C G 投与時に比べて化合物番号 3 0 5、K i S S - 3 2 2 投与時ではプロゲステロン濃度が低いことから、これら誘導体の卵巣に対する刺激作用は h C G よりも緩和であることが示唆された。

産業上の利用可能性

本発明のメタスチン誘導体またはその塩あるいはそのプロドラッグは、優れた癌転移抑制作用や癌増殖抑制作用に加え、優れた血中安定性を有しており、癌 (例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膵癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等) の予防・治療薬として有用である。本発明のメタスチン誘導体またはその塩あるいはそのプロドラッグは、膵臓機能調節作用を有しており、膵臓疾患 (例えば、急性

または慢性膵炎、膵癌等)の予防・治療薬として有用である。本発明のメタスチン誘導体またはその塩あるいはそのプロドラッグは、胎盤機能調節作用を有しており、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の發育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防・治療薬とし

5 て有用である。

また、本発明のメタスチン誘導体またはその塩あるいはそのプロドラッグを含むメタスチン受容体アゴニストは、血糖上昇作用、膵グルカゴン分泌促進作用、尿生成促進作用を有しており、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜

10 症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療薬として有用である。

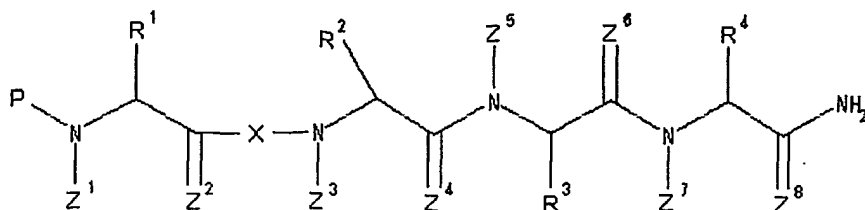
さらに、本発明のメタスチン誘導体またはその塩あるいはそのプロドラッグは、優れた性腺刺激ホルモン分泌促進活性、性ホルモン分泌促進

15 活性、排卵誘発または促進作用等を有し、低毒性で安全な、例えば、性腺機能改善剤、ホルモン依存性癌（例えば、前立腺癌、乳癌等）、不妊症、子宮内膜症、子宮筋腫等の予防・治療剤、排卵誘発または促進剤、性腺刺激ホルモン分泌促進剤または性ホルモン分泌促進剤などとして有用である。

20 さらに、本発明のメタスチン誘導体またはその塩あるいはそのプロドラッグは、アルツハイマー病、軽度認知障害などの予防・治療剤などとして有用である。

請求の範囲

1. 式



- 5 〔式中、 Z^1 、 Z^3 、 Z^5 および Z^7 はそれぞれ水素原子または C_{1-3} アルキル基を、 Z^2 、 Z^4 、 Z^6 および Z^8 はそれぞれ水素原子、OまたはSを、
- R^1 は（1）水素原子または（2）置換されていてもよいカルバモイル基、置換されていてもよいヒドロキシル基および置換されていてもよい芳香族環基から成る群から選ばれる基で置換されていてもよい C_{1-8} アルキル基を、
- 10 R^2 は（1）水素原子または（2）環状または鎖状の C_{1-10} アルキル基または（3）環状アルキル基と鎖状アルキル基からなる C_{1-10} アルキル基を、
- 15 R^3 は（1）置換されていてもよい塩基性基を有し、さらに他の置換基を有していてもよい C_{1-8} アルキル基、
- （2）置換されていてもよい塩基性基を有し、さらに他の置換基を有していてもよいアラルキル基、
- （3）置換されていてもよい塩基性基を有している炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基を有し、さらに他の置換基を有していてもよい C_{1-4} アルキル基、または
- 20 （4）置換されていてもよい塩基性基を有している炭素数7以下の非芳香性複素環基を有し、さらに他の置換基を有していてもよい C_{1-4} アルキル基を、
- 25 R^4 は（1）置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基、
- （2）置換されていてもよい、1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、

酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる
5 5 ないし 14 員芳香族複素環基、

(3) 置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基、

(4) 置換されていてもよい、3 ないし 11 個の炭素原子と、窒素原子
5 、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる
5 5 ないし 14 員芳香族縮合複素環基、

(5) 置換されていてもよい炭素数 7 以下の非芳香性環状炭化水素基、
および

(6) 置換されていてもよい炭素数 7 以下の非芳香性複素環基、

10 から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル
基を、

X は式 $-NHCH(Q^1)YQ^2C(=Z^9)-$

(式中、 Q^1 は (1) 置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基

15 (2) 置換されていてもよい、1 ないし 7 個の炭素原子と、窒素原子、
酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる
5 5 ないし 14 員芳香族複素環基、

(3) 置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基、

(4) 置換されていてもよい、3 ないし 11 個の炭素原子と、窒素原子
20 、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる
5 5 ないし 14 員芳香族縮合複素環基、

(5) 置換されていてもよい炭素数 7 以下の非芳香性環状炭化水素基、
および

(6) 置換されていてもよい炭素数 7 以下の非芳香性複素環基、

25 から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル
基を、 Q^2 は (1) カルバモイル基およびヒドロキシル基から成る群から
選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル基で置換され
ていてもよい CH_2 、(2) カルバモイル基およびヒドロキシル基から
成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル基で

置換されていてもよいNHまたは(3) Oを、

Yは C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい、式 $-CONH-$ 、 $-CSNH-$ 、 $-CH_2NH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-CH_2S-$ または $-CH_2CH_2-$ で表わされる基を、

5 Z⁹は水素原子、OまたはSを示す)で表わされる基を、

Pは(1) 水素原子、

(2) 配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列の第1~48番目のアミノ酸配列のC末端側から任意の連続したまたは不連続に結合したアミノ酸残基、

10 (3) 式 $J^1 - J^2 - C(J^3)(Q^3)Y^1C(J^4)(Q^4)Y^2C(J^5)(Q^5)Y^3C(J^6)(Q^6)C(=Z^{10}) -$

(式中、J¹は(a) 水素原子または(b) 置換基を有していてもよい環基を含む置換基で置換されていてもよい、(i) C_{1-15} アシル基、

(ii) C_{1-15} アルキル基、(iii) C_{6-14} アリール基、(iv) カルバモイル基、(v) カルボキシ基、(vi) スルフィノ基、(vii) アミジノ基、または(viii) グリオキシロイル基を、

J²は(1) C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよいNH、(2) C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい CH_2 、(3) Oまたは(4) Sを、

20 J³~J⁶はそれぞれ水素原子または C_{1-3} アルキル基を、

Q³~Q⁶はそれぞれ、

(1) 置換されていてもよい C_{6-12} 芳香族炭化水素基、

(2) 置換されていてもよい、1ないし7個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族複素環基、

(3) 置換されていてもよい C_{8-14} 芳香族縮合環基、

(4) 置換されていてもよい、3ないし11個の炭素原子と、窒素原子、酸素原子および硫黄原子から成る群から選ばれるヘテロ原子とからなる5ないし14員芳香族縮合複素環基、

- (5) 置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性環状炭化水素基、
- (6) 置換されていてもよい炭素数7以下の非芳香性複素環基、
- (7) 置換されていてもよいアミノ基、
- 5 (8) 置換されていてもよいグアニジノ基、
- (9) 置換されていてもよいヒドロキシル基、
- (10) 置換されていてもよいカルボキシル基、
- (11) 置換されていてもよいカルバモイル基、および
- (12) 置換されていてもよいスルフヒドリル基
- 10 から成る群から選ばれる置換基を有していてもよい C_{1-4} アルキル基又は水素原子を示し、
- J^3 と Q^3 、 J^4 と Q^4 、 J^5 と Q^5 、 J^6 と Q^6 が結合することで、あるいは J^2 と Q^3 、 Y^1 と Q^4 、 Y^2 と Q^5 、 Y^3 と Q^6 が結合することで環を形成してもよい、
- 15 $Y^1 \sim Y^3$ はそれぞれ $-CON(J^{13})-$ 、 $-CSN(J^{13})-$ 、 $-C(J^{14})N(J^{13})-$ または $-N(J^{13})CO-$ (J^{13} および J^{14} はそれぞれ水素原子または C_{1-3} アルキル基を示す)で示される基を示し、
- Z^{10} は水素原子、OまたはSを示す)で表わされる基、
- (4) 式 $J^1 - J^2 - C(J^7)(Q^7)Y^2C(J^8)(Q^8)Y^3C(J^9)$
 20 $(Q^9)C(=Z^{10})-$
- (式中、 J^1 および J^2 はそれぞれ前記と同意義を、
- $J^7 \sim J^9$ は J^3 と同意義を、
- $Q^7 \sim Q^9$ は Q^3 と同意義を、
- Y^2 および Y^3 は前記と同意義を、
- 25 Z^{10} は前記と同意義を示し、
- J^7 と Q^7 、 J^8 と Q^8 、 J^9 と Q^9 が結合することで、あるいは J^2 と Q^7 、 Y^2 と Q^8 、 Y^3 と Q^9 が結合することで環を形成してもよい。)で表わされる基、
- (5) 式 $J^1 - J^2 - C(J^{10})(Q^{10})Y^3C(J^{11})(Q^{11})C$

($= Z^{10}$) -

(式中、 J^1 および J^2 は前記と同意義を、

J^{10} および J^{11} は J^3 と同意義を、

Q^{10} および Q^{11} は Q^3 と同意義を、

5 Y^3 は前記と同意義を、

Z^{10} は前記と同意義を示し、

J^{10} と Q^{10} 、 J^{11} と Q^{11} が結合することで、あるいは J^2 と Q^{10} 、 Y^3 と Q^{11} が結合することで環を形成してもよい。) で表わされる基、

(6) 式 $J^1 - J^2 - C(J^{12})(Q^{12})C(=Z^{10}) -$

10 (式中、 J^1 および J^2 は前記と同意義を、

J^{12} は J^3 と同意義を、

Q^{12} は Q^3 と同意義を、

Z^{10} は前記と同意義を示し、

J^{12} と Q^{12} が結合することで、あるいは J^2 と Q^{12} が結合することで

15 環を形成してもよい。) で表わされる基、または

(7) 式 $J^1 -$ (J^1 は前記と同意義を示す) で表わされる基を示す

。) で表わされるメタスチン誘導体 (I) (ただし、配列番号: 1 で表

わされるアミノ酸配列の第1~54番目、第2~54番目、第3~54

番目、第4~54番目、第5~54番目、第6~54番目、第7~54

20 番目、第8~54番目、第9~54番目、第10~54番目、第11~

54番目、第12~54番目、第13~54番目、第14~54番目、

第15~54番目、第16~54番目、第17~54番目、第18~5

4番目、第19~54番目、第20~54番目、第21~54番目、第

22~54番目、第23~54番目、第24~54番目、第25~54

25 番目、第26~54番目、第27~54番目、第28~54番目、第2

9~54番目、第30~54番目、第31~54番目、第32~54番

目、第33~54番目、第34~54番目、第35~54番目、第36

~54番目、第37~54番目、第38~54番目、第39~54番目

、第40~54番目、第41~54番目、第42~54番目、第43~

5 4 番目、第 4 4 ~ 5 4 番目、第 4 5 ~ 5 4 番目、第 4 6 ~ 5 4 番目、
第 4 7 ~ 5 4 番目、第 4 8 ~ 5 4 番目または第 4 9 ~ 5 4 番目のアミノ
酸配列からなるペプチドを除く) またはその塩。

2. (i) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂ (化
5 合物番号141) 、

(ii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg (Me) -Trp-NH₂ (化合物
番号174) 、

(iii) 3-(3-Indolyl) propionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -
Phe-NH₂ (化合物番号260) 、

10 (iv) 3-Phenylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂ (
化合物番号269) 、

(v) 2-(indol-3-yl) ethylcarbamoyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-
Arg (Me) -Phe-NH₂ (化合物番号279) 、

(vi) D-Tyr-Asn-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂ (
15 化合物番号286) 、

(vii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe Ψ (CSNH) Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
(化合物番号296) 、

(viii) Tyr Ψ (CH₂NH) Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -
Phe-NH₂ (化合物番号300) 、

20 (ix) D-Tyr-D-Asn-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
(化合物番号303) 、

(x) D-Tyr-D-Pya (4) -Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂ (化
合物番号305) 、

(xi) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe (4F) -NH₂ (
25 化合物番号318) 、

(xii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe Ψ (NHCO) Gly-Leu-Arg (Me) -Phe-NH₂
(化合物番号319) 、

(xiii) 3-Pyridylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg (Me) -Phe-
NH₂ (化合物番号322) 、

(xiv) 4-Imidazoleacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂
(化合物番号323)、

(xv) D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂ (化合物番号385)、または

- 5 (xvi) D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂ (化合物番号386) である請求項1記載のメタスチン誘導体(I) またはその塩。

3. 請求項1記載のメタスチン誘導体(I) またはその塩のプロドラッグ。

- 10 4. 請求項1記載のメタスチン誘導体(I) またはその塩あるいはそのプロドラッグを含有してなる医薬。

5. 癌転移抑制剤または癌増殖抑制剤である請求項4記載の医薬。

6. 癌の予防・治療剤である請求項4記載の医薬。

7. 膵臓機能調節剤である請求項4記載の医薬。

- 15 8. 急性もしくは慢性膵炎または膵癌の予防・治療剤である請求項4記載の医薬。

9. 胎盤機能調節剤である請求項4記載の医薬。

10 10. 絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防・治療剤である請求項4記載の医薬。

11. 性腺機能改善剤である請求項4記載の医薬。

12. ホルモン依存性癌、不妊症、子宮内膜症または子宮筋腫の予防・治療剤である請求項4記載の医薬。

13. 排卵誘発または促進剤である請求項4記載の医薬。

- 25 14. 性腺刺激ホルモン分泌促進剤または性ホルモン分泌促進剤である請求項4記載の医薬。

15. アルツハイマー病または軽度認知障害の予防・治療剤である請求項4記載の医薬。

16. 哺乳動物に対して、請求項1記載のメタスチン誘導体(I) また

はその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする癌転移抑制または癌増殖抑制方法。

17. 哺乳動物に対して、請求項1記載のメタスチン誘導体(I) またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする癌の予防・治療方法。

18. 哺乳動物に対して、請求項1記載のメタスチン誘導体(I) またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする脾臓機能調節方法。

19. 哺乳動物に対して、請求項1記載のメタスチン誘導体(I) またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする急性もしくは慢性脾炎または脾癌の予防・治療方法。

20. 哺乳動物に対して、請求項1記載のメタスチン誘導体(I) またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする胎盤機能調節方法。

21. 哺乳動物に対して、請求項1記載のメタスチン誘導体(I) またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防・治療方法。

22. 哺乳動物に対して、請求項1記載のメタスチン誘導体(I) またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする性腺機能改善方法。

23. 哺乳動物に対して、請求項1記載のメタスチン誘導体(I) またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とするホルモン依存性癌、不妊症、子宮内膜症または子宮筋腫の予防・治療方法。

24. 哺乳動物に対して、請求項1記載のメタスチン誘導体(I) またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする排卵誘発または促進方法。

25. 哺乳動物に対して、請求項1記載のメタスチン誘導体(I) また

はその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とする性腺刺激ホルモン分泌促進方法または性ホルモン分泌促進方法。

26. 哺乳動物に対して、請求項1記載のメタスチン誘導体(I)またはその塩あるいはそのプロドラッグの有効量を投与することを特徴とするアルツハイマー病または軽度認知障害の予防・治療方法。

27. 癌転移抑制剤または癌増殖抑制剤を製造するための請求項1記載のメタスチン誘導体(I)またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用。

28. 癌の予防・治療剤を製造するための請求項1記載のメタスチン誘導体(I)またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用。

29. 膵臓機能調節剤を製造するための請求項1記載のメタスチン誘導体(I)またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用。

30. 急性もしくは慢性膵炎または膵癌の予防・治療剤を製造するための請求項1記載のメタスチン誘導体(I)またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用。

31. 胎盤機能調節剤を製造するための請求項1記載のメタスチン誘導体(I)またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用。

32. 絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防・治療剤を製造するための請求項1記載のメタスチン誘導体(I)またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用。

33. 性腺機能改善剤を製造するための請求項1記載のメタスチン誘導体(I)またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用。

34. ホルモン依存性癌、不妊症、子宮内膜症または子宮筋腫の予防・治療剤を製造するための請求項1記載のメタスチン誘導体(I)またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用。

35. 排卵誘発または促進剤を製造するための請求項1記載のメタスチン誘導体(I)またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用。

36. 性腺刺激ホルモン分泌促進剤または性ホルモン分泌促進剤を製造

するための請求項 1 記載のメタスチン誘導体 (I) またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用。

37. アルツハイマー病または軽度認知障害の予防・治療剤を製造するための請求項 1 記載のメタスチン誘導体 (I) またはその塩あるいはそのプロドラッグの使用。

38. メタスチン受容体アゴニストを含有してなる膵グルカゴン分泌促進剤。

39. メタスチン受容体アゴニストを含有してなる尿生成促進剤。

40. メタスチン受容体アゴニストを含有してなる肥満、高脂血症、2 型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤。

41. メタスチン受容体アゴニストが請求項 1 記載のメタスチン誘導体 (I) またはその塩あるいはそのプロドラッグである請求項 38～40 記載の剤。

42. 哺乳動物に対して、メタスチン受容体アゴニストの有効量を投与することを特徴とする膵グルカゴン分泌促進方法。

43. 哺乳動物に対して、メタスチン受容体アゴニストの有効量を投与することを特徴とする尿生成促進方法。

44. 哺乳動物に対して、メタスチン受容体アゴニストの有効量を投与することを特徴とする肥満、高脂血症、2 型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療方法。

45. 膵グルカゴン分泌促進剤を製造するためのメタスチン受容体アゴニストの使用。

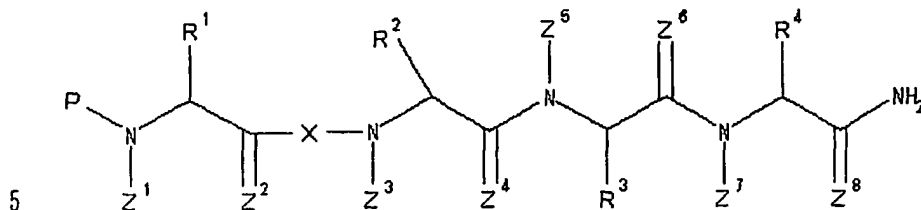
46. 尿生成促進剤を製造するためのメタスチン受容体アゴニストの使

用。

47. 肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、排尿困難症、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマ、
- 5 動脈硬化、血栓性疾患または脂肪毒性の予防・治療剤を製造するためのメタスチン受容体アゴニストの使用。

要約書

本発明は、血中安定性に優れ、癌転移抑制作用又は癌増殖抑制作用を有するメタスチン誘導体を提供する。具体的には、本発明は式



〔式中、 Z^1 、 Z^3 、 Z^5 及び Z^7 はH又は C_{1-3} アルキル基を、 Z^2 、 Z^4 、 Z^6 及び Z^8 はH、O又はSを、 R^1 は(1) H、(2) カルバモイル基、ヒドロキシル基及び芳香族環基から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-8} アルキル基を、 R^2 は(1) H又は(2) 環状又は鎖状の C_{1-10} アルキル基又は(3) 環状アルキル基と鎖状アルキル基からなる C_{1-10} アルキル基を、 R^3 は塩基性基を有する C_{1-8} アルキル基、塩基性基を有するアラルキル基、塩基性基を有する炭素数7以下の非芳香性炭素環基を有する C_{1-4} アルキル基、又は塩基性基を有している炭素数7以下の非芳香性複素環基を有する C_{1-4} アルキル基を、 R^4 は C_{6-12} 芳香族炭素環基、芳香族複素環基、 C_{8-14} 芳香族縮合環基、芳香族縮合複素環基、非芳香性炭素環基及び炭素数7以下の非芳香性複素環基から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル基を、Xは $-NHCH(Q^1)YQ^2C(=Z^9)-$ (Q^1 は C_{6-12} 芳香族炭素環基、芳香族複素環基、 C_{8-14} 芳香族縮合環基、芳香族縮合複素環基、炭素数7以下の非芳香性炭素環基及び炭素数7以下の非芳香性複素環基から成る群から選ばれる置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル基を、 Q^2 は CH_2 、NH又はOを、Yは $-CONH-$ 、 $-CSNH-$ 、 $-CH_2NH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-CH_2S-$ 又は CH_2CH_2- を、 Z^9 はH、O又はSを、Pは(1) H、(2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第1～4

10

15

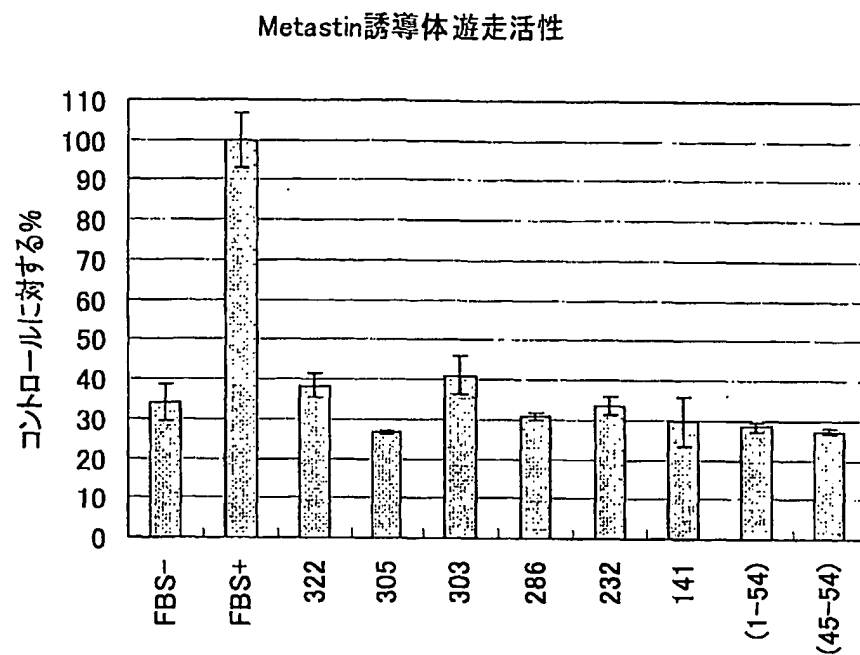
20

25

8 番目のアミノ酸配列のC末端側から任意の連続した又は不連続に結合したアミノ酸残基、(3) $J^1 - J^2 - C(J^3)(Q^3)Y^1C(J^4)(Q^4)Y^2C(J^5)(Q^5)Y^3C(J^6)(Q^6)C(=Z^{10}) -$ (J^1 は (a) H又は (b) 環基で置換されていてもよい、(i) C_{1-15} アシル基、(ii) C_{1-15} アルキル基、(iii) カルバモイル基、(iv) C_{1-15} アルキルカルバモイル基、(v) C_{1-15} アルカノイルカルバモイル基、(vi) アミノカルバモイル基、(vii) C_{1-15} アルキルアミノカルバモイル基、(viii) オキシカルボニル基、(ix) C_{1-15} アルコキシカルボニル基、(x) スルホニル基、(xi) アミジノ基、(xii) C_{1-15} アルキルアミジノ基、(xiii) C_{1-15} アシルアミジノ基、(xiv) C_{1-15} アルキルスルホニル基又は (xv) オキサリル基を、 J^2 はNH、 CH_2 、O又はSを、 $J^3 \sim J^6$ はH又は C_{1-3} アルキル基を、 $Q^3 \sim Q^6$ は C_{6-12} 芳香族炭素環基、芳香族複素環基、 C_{8-14} 芳香族縮合環基、芳香族縮合複素環基、炭素数7以下の非芳香性炭素環基及び炭素数7以下の非芳香性複素環基、アミノ基、グアニジノ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、カルバモイル基及びスルフヒドリル基から成る群から選ばれる置換基を有していてもよい C_{1-4} アルキル基又はHを示し、 J^3 と Q^3 、 J^4 と Q^4 、 J^5 と Q^5 、 J^6 と Q^6 が結合することで、あるいは J^2 と Q^3 、 Y^1 と Q^4 、 Y^2 と Q^5 、 Y^3 と Q^6 が結合することで環を形成してもよい、 $Y^1 \sim Y^3$ は $-CON(J^{13})-$ 、 $-CSN(J^{13})-$ 、 $-C(J^{14})N(J^{13})-$ 又は $N(J^{13})CO-$ (J^{13} 及び J^{14} はH又は C_{1-3} アルキル基)で示される基を示し、 Z^{10} はH、O又はS)で表わされる基、(4) $J^1 - J^2 - C(J^7)(Q^7)Y^2C(J^8)(Q^8)Y^3C(J^9)(Q^9)C(=Z^{10}) -$ (J^1 及び J^2 は前記と同意義、 $J^7 \sim J^9$ は J^3 と同意義、 $Q^7 \sim Q^9$ は Q^3 と同意義、 Y^2 及び Y^3 は前記と同意義、 Z^{10} は前記と同意義、 J^7 と Q^7 、 J^8 と Q^8 、 J^9 と Q^9 が結合することで、あるいは J^2 と Q^7 、 Y^2 と Q^8 、 Y^3 と Q^9 が結合することで環を形成してもよい)で表わされる基、(5) $J^1 - J^2 - C(J^{10})(Q^{10})Y^3C(J^{11})(Q^{11})C(=Z^{10}) -$ (J^1 及び J

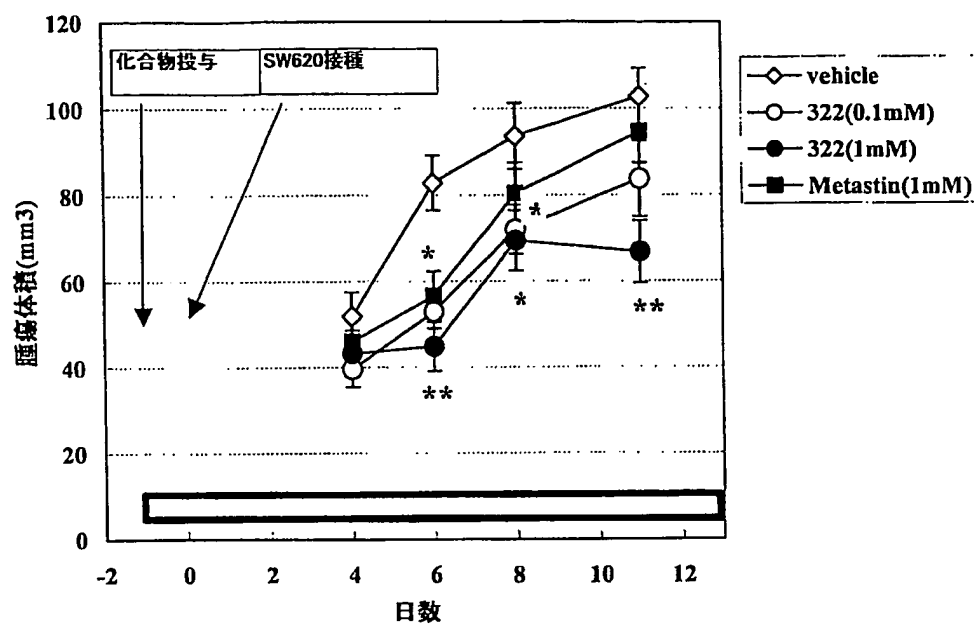
1/22

図 1



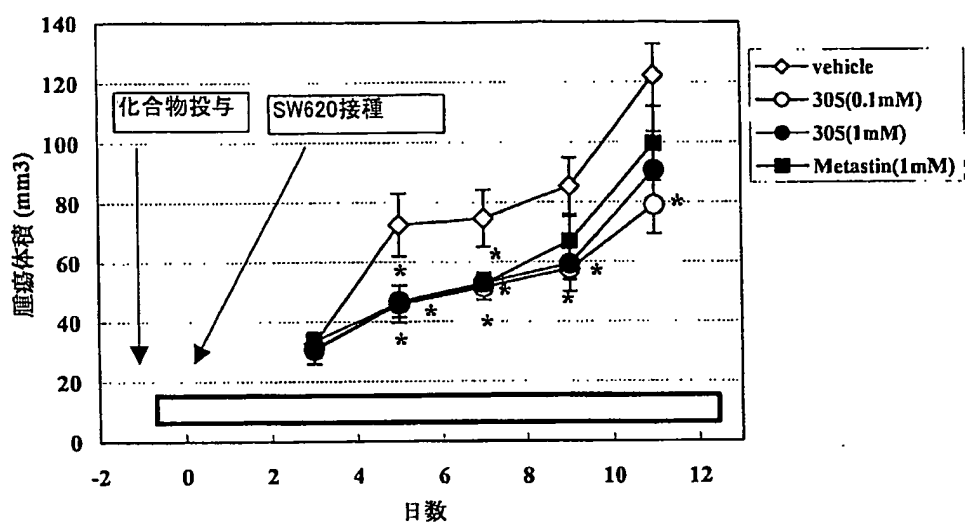
2/22

図2



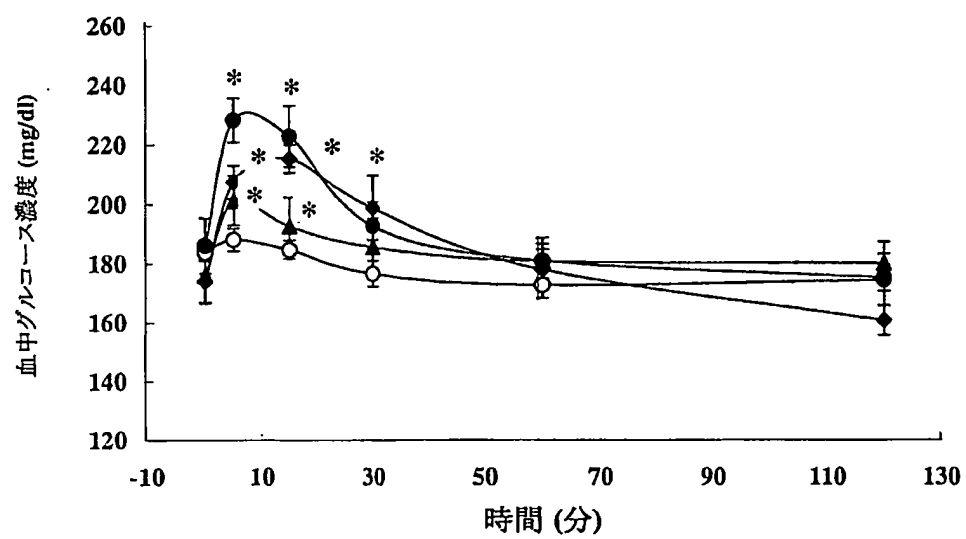
3/22

図3



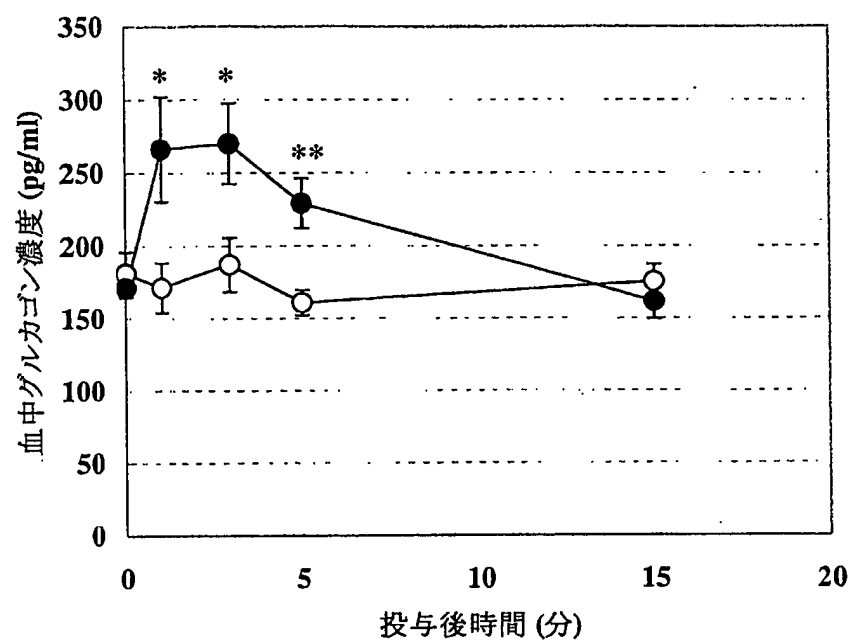
4/22

図4



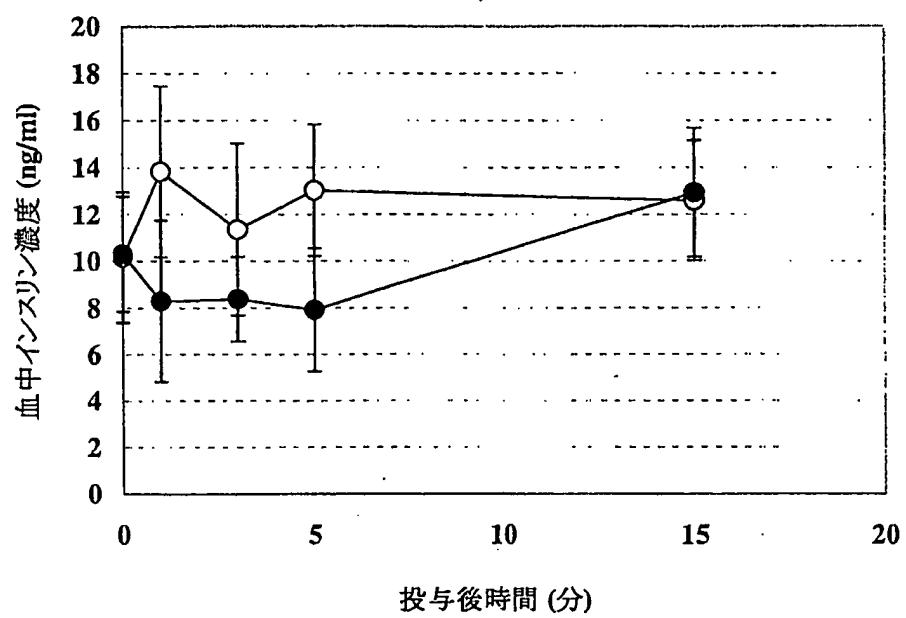
5/22

図5



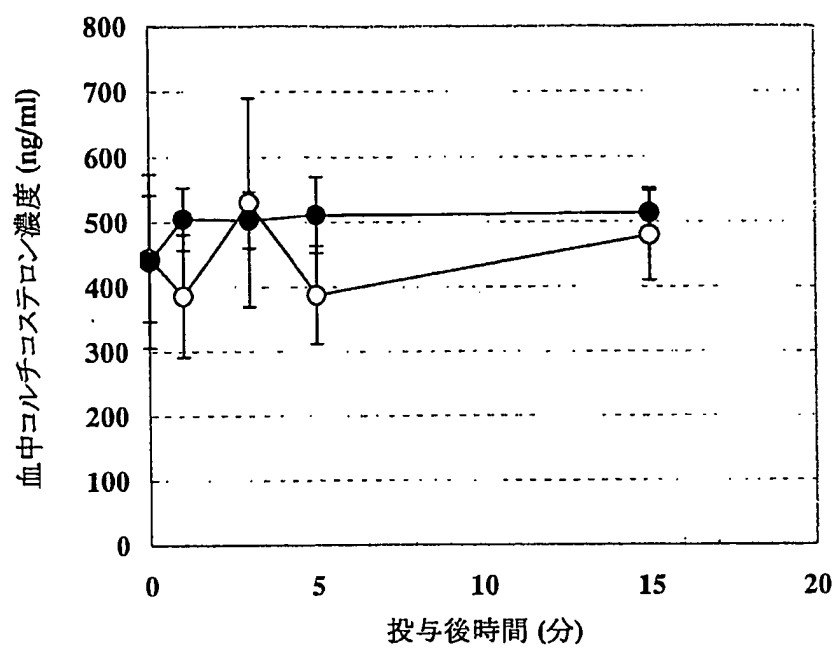
6/22

図6



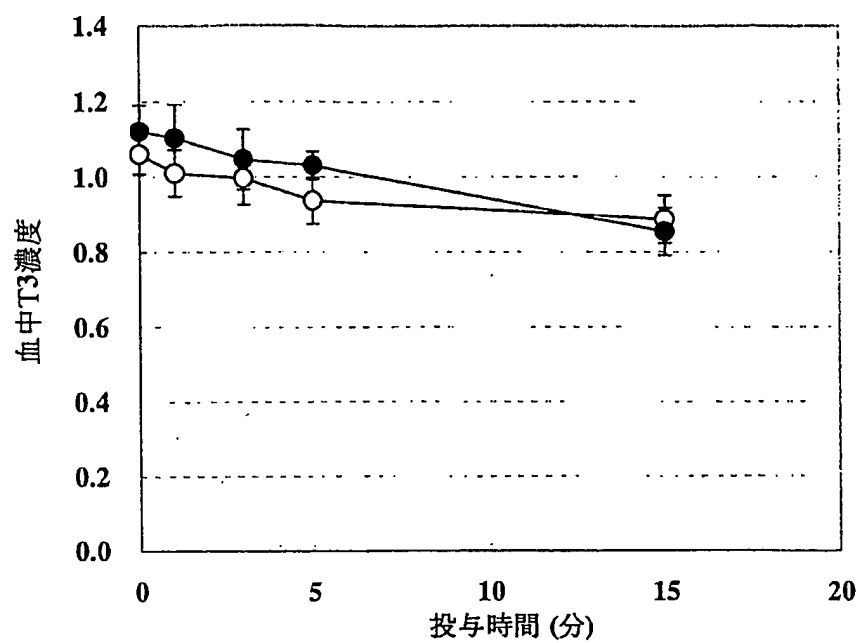
7/22

図7



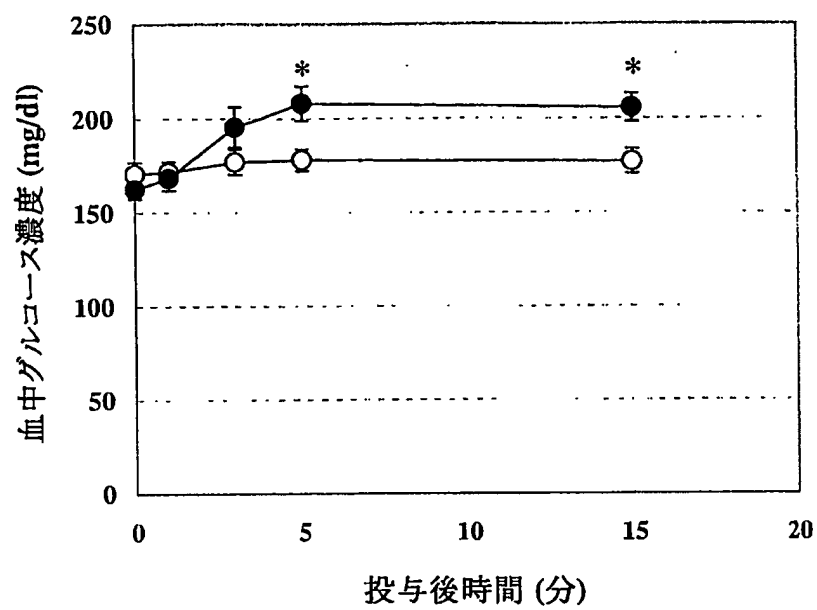
8/22

図8



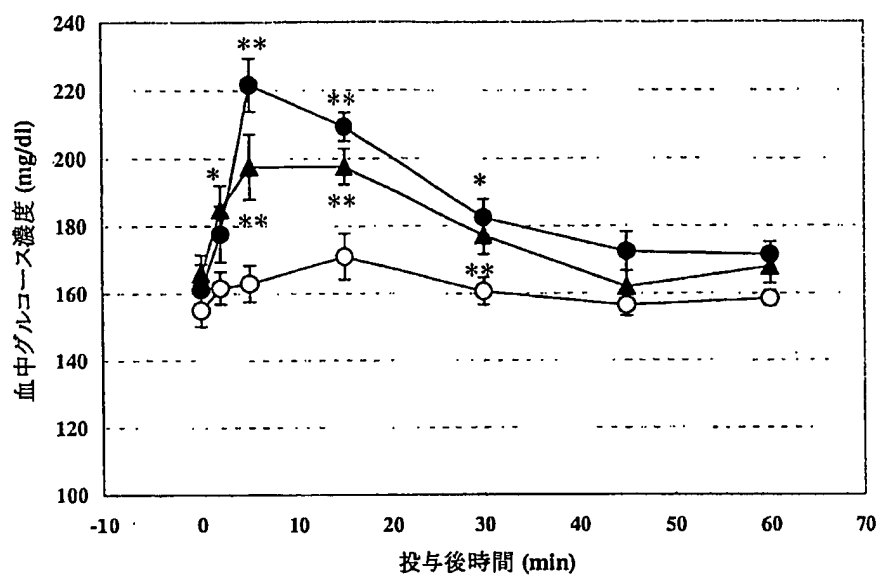
9/ 22

図9



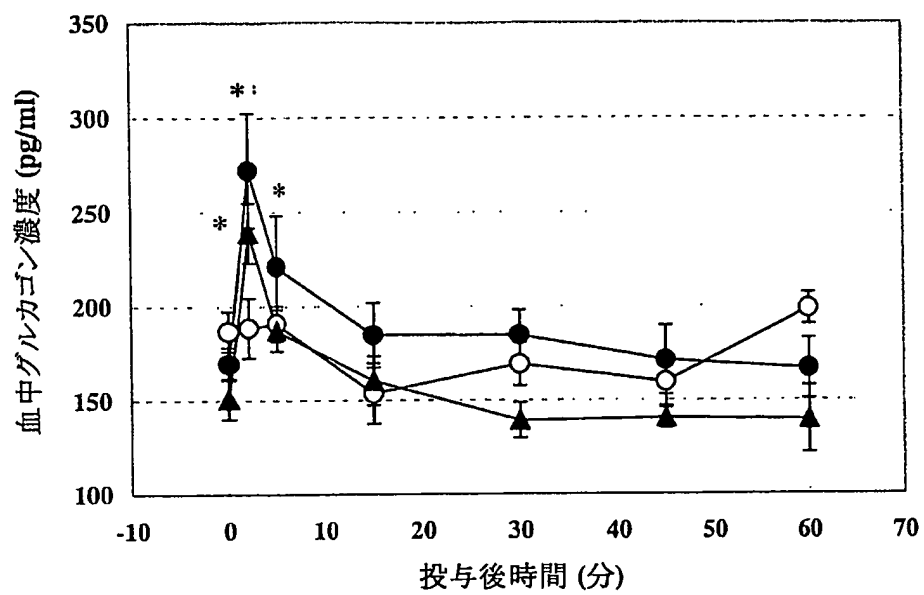
10/22

図10



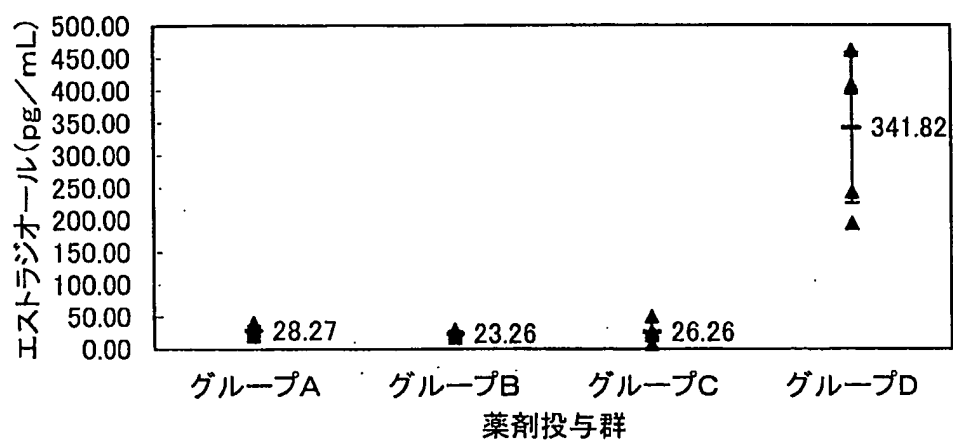
11/22

図11



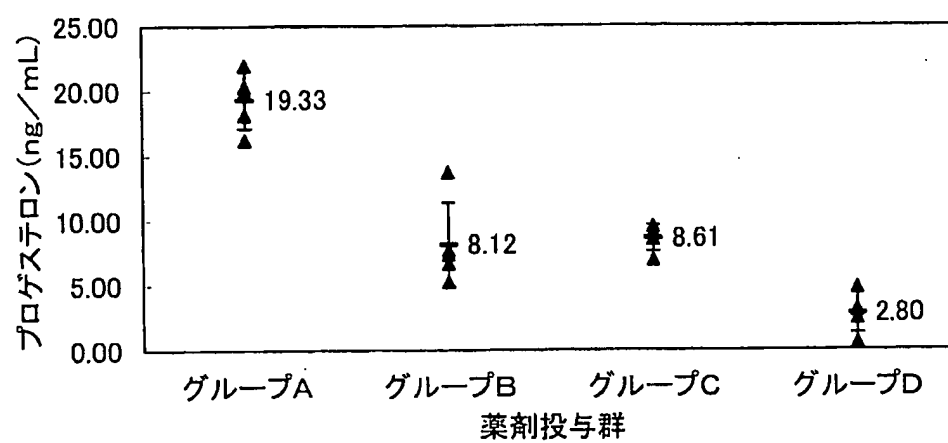
12/22

図 12



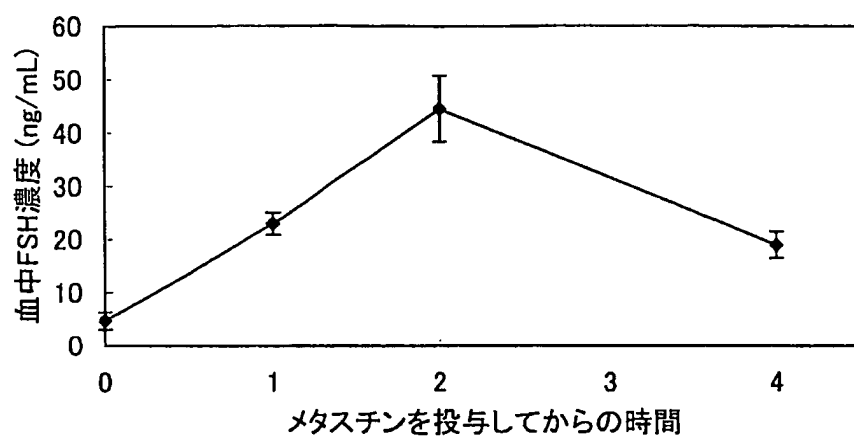
13/ 22

図 1 3



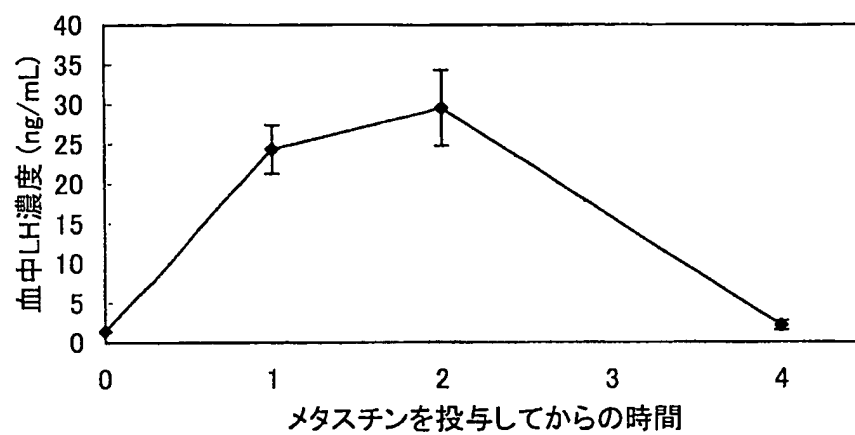
14/ 22

図 1 4



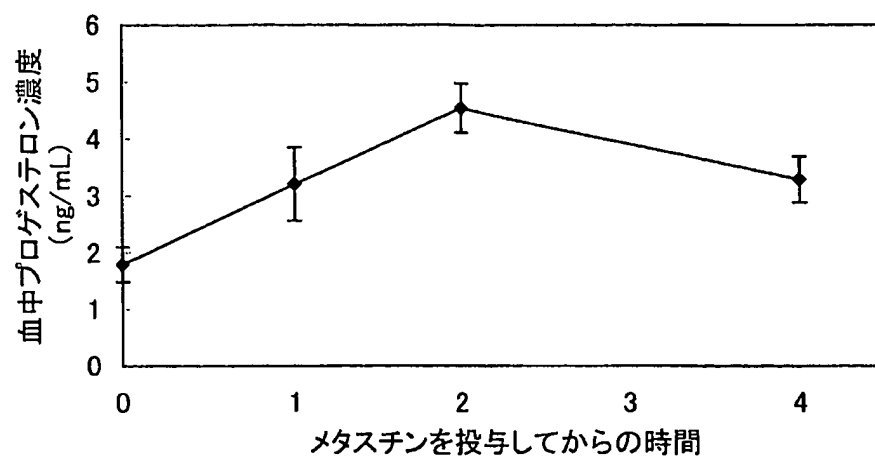
15/22

図15



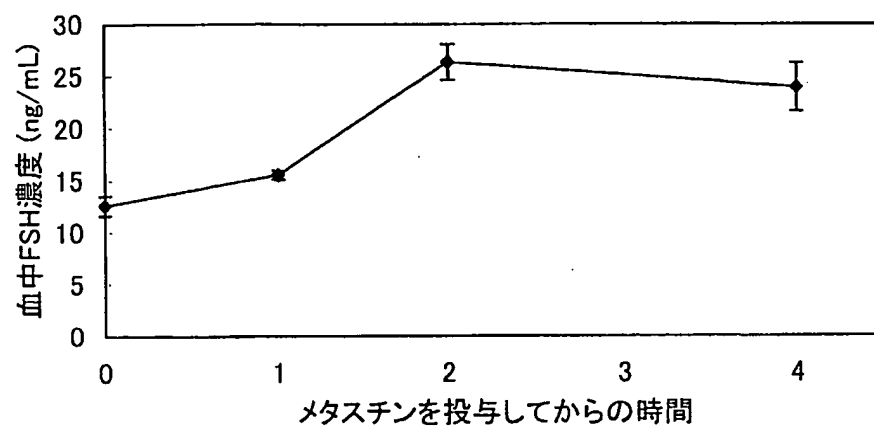
16/ 22

図 16



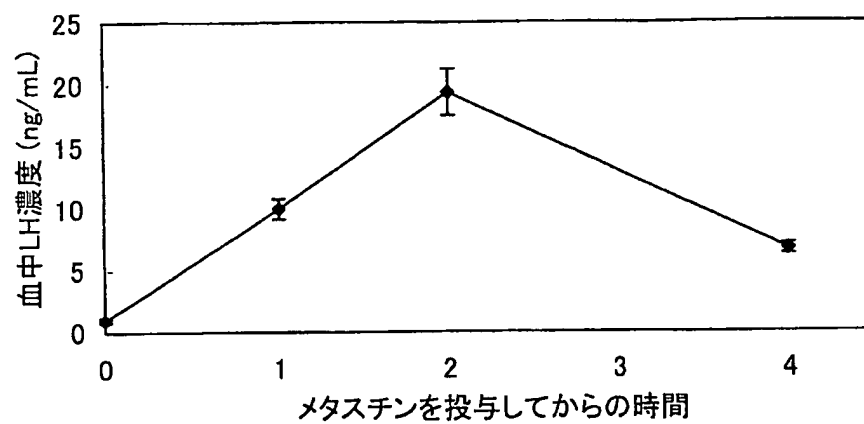
17/22

図17



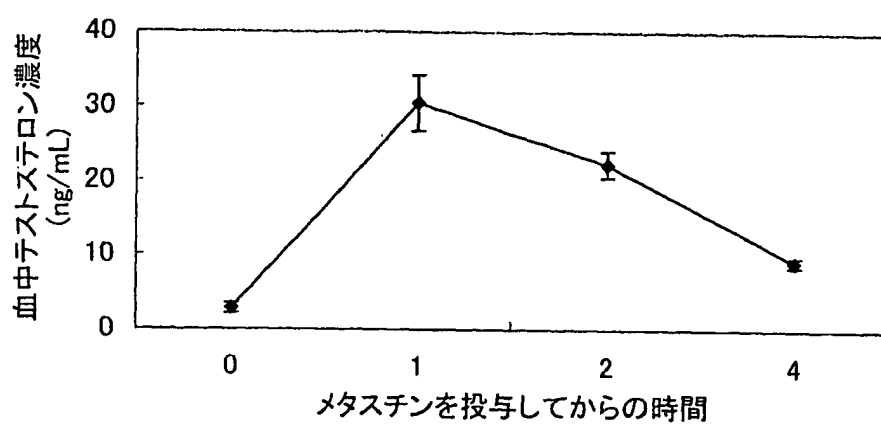
18/ 22

図 18



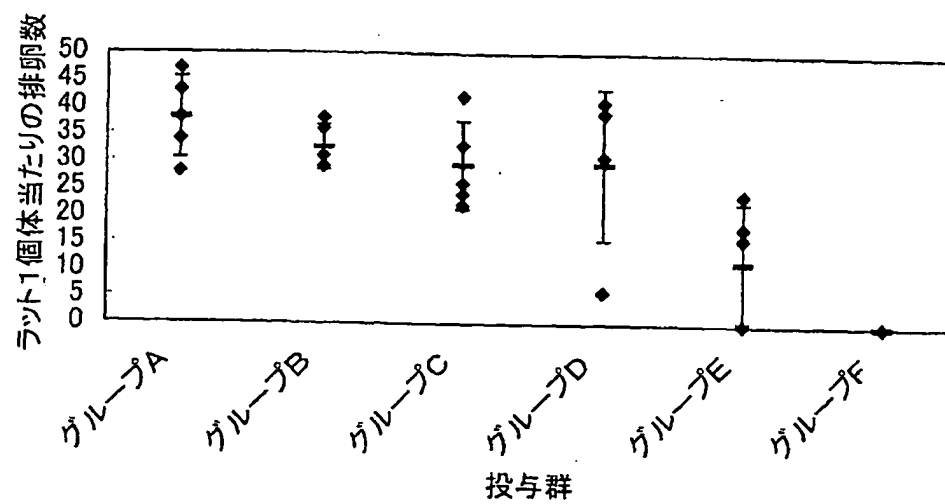
19/22

図 19



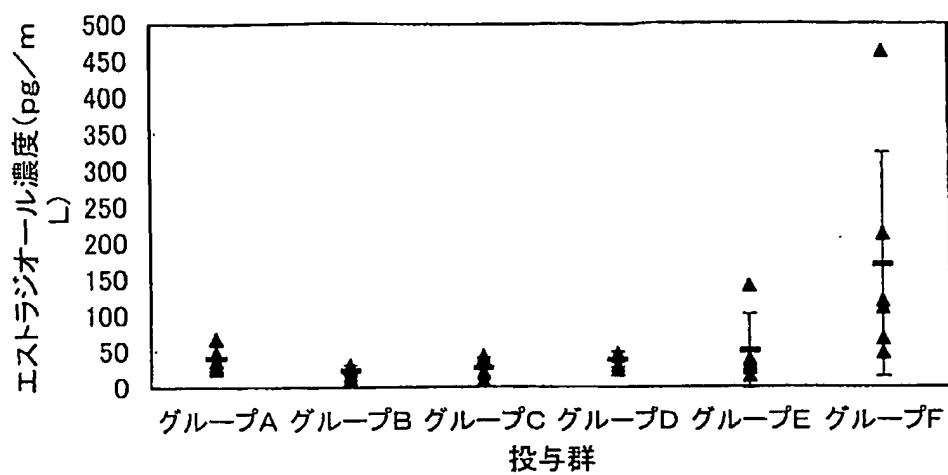
20/22

図 20



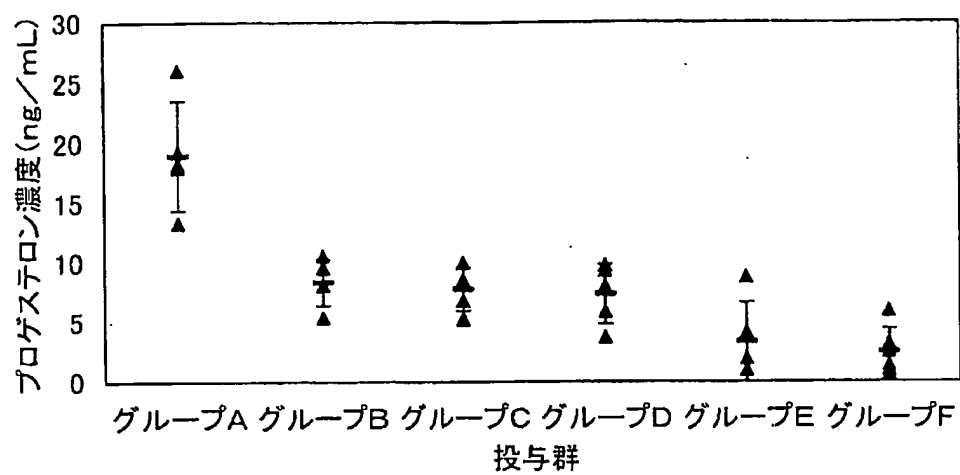
21/22

図 2 1



22/22

図 2 2



1/13

[SEQUENCE LISTING]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Metastatin Derivatives And Its Use

<130> P03-0131PCT

<150> JP 2002-377179

<151> 2002-12-26

<160> 22

<210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly	Thr	Ser	Leu	Ser	Pro	Pro	Pro	Glu	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	Gln	Gln
1				5					10					15	
Pro	Gly	Leu	Ser	Ala	Pro	His	Ser	Arg	Gln	Ile	Pro	Ala	Pro	Gln	Gly
			20					25					30		
Ala	Val	Leu	Val	Gln	Arg	Glu	Lys	Asp	Leu	Pro	Asn	Tyr	Asn	Trp	Asn
		35					40					45			
Ser	Phe	Gly	Leu	Arg	Phe										
			50												

<210> 2

<211> 162

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggtacttctc	tgtctccgcc	gccggaatct	tctggttctc	gtcagcagcc	gggtctgtct	60
gctccgcact	ctcgtcagat	cccggctccg	cagggtgctg	ttctggttca	gcgtgaaaaa	120
gacctgcoga	actacaactg	gaactctttc	ggtctgcgtt	tc		162

2/13

<210> 3

<211> 152

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 3

```

Met Tyr Leu Arg Phe Gly Val Asp Val Cys Ser Leu Ser Pro Trp Lys
      5              10              15
Glu Thr Val Asp Leu Pro Leu Pro Pro Arg Met Ile Ser Met Ala Ser
      20              25              30
Trp Gln Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Thr Tyr Gly Glu Pro Leu
      35              40              45
Ala Lys Val Ala Pro Gly Ser Thr Gly Gln Gln Ser Gly Pro Gln Glu
      50              55              60
Leu Val Asn Ala Trp Glu Lys Glu Ser Arg Tyr Ala Glu Ser Lys Pro
      65              70              75              80
Gly Ser Ala Gly Leu Arg Ala Arg Arg Ser Ser Pro Cys Pro Pro Val
      85              90              95
Glu Gly Pro Ala Gly Arg Gln Arg Pro Leu Cys Ala Ser Arg Ser Arg
      100             105             110
Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp
      115             120             125
Leu Ser Thr Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Tyr Gly Arg Arg
      130             135             140
Gln Ala Ala Arg Ala Ala Arg Gly
145              150

```

<210> 4

<211> 456

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 4

```

atgtatctga gatttggcgt tgatgtctgc agcctgagtc cctggaagga gactgtagac 60
ctgccccttc ctcccagaat gatctcaatg gcttcttggc agctgctgct tctcctctgt 120
gtcgccacct atggggagcc gctggcaaaa gtgaagcctg gatccacagg ccagcagtcc 180
ggaccccagg aactcggtta tgcctgggaa aaggaatcgc ggtatgcaga gagcaagcct 240
gggtctgcag ggctgcgcgc tcgtaggtcg tcgccatgcc cgccggttga gggccccgcg 300

```

3/13

gggcgccagc ggccccctgtg tgcctcccgc agtcgcctga tccctgcgcc ccgcggagcg 360
 gtgctgggtgc agcgggagaa ggacctgtcc acctacaact ggaactcctt cggcctgcgc 420
 tacggcagga ggcaggcggc gcgggcagca cggggc 456

<210> 5

<211> 156

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Met Tyr Leu Arg Phe Gly Val Asp Val Cys Ser Leu Ser Pro Trp Lys
 5 10 15
 Glu Thr Val Asp Leu Pro Leu Pro Pro Arg Met Ile Ser Met Ala Ser
 20 25 30
 Trp Gln Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Thr Tyr Gly Glu Pro Leu
 35 40 45
 Ala Lys Val Ala Pro Leu Val Lys Pro Gly Ser Thr Gly Gln Gln Ser
 50 55 60
 Gly Pro Gln Glu Leu Val Asn Ala Trp Glu Lys Glu Ser Arg Tyr Ala
 65 70 75 80
 Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ala Gly Leu Arg Ala Arg Arg Ser Ser Pro
 85 90 95
 Cys Pro Pro Val Glu Gly Pro Ala Gly Arg Gln Arg Pro Leu Cys Ala
 100 105 110
 Ser Arg Ser Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Ala Val Leu Val Gln
 115 120 125
 Arg Glu Lys Asp Leu Ser Thr Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg
 130 135 140
 Tyr Gly Arg Arg Gln Ala Ala Arg Ala Ala Arg Gly
 145 150 155

<210> 6

<211> 468

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

atgtatctga gatttggcgt tgatgtctgc agcctgagtc cctggaagga gactgtagac 60

4/13

```

ctgcccccttc ctcccagaat gatctcaatg gcttcttggc agctgctgct tctcctctgt 120
gtcgccacct atggggagcc gctggcaaaa gtggcacctt tggatgaagcc tggatccaca 180
ggccagcagt ccggacccca ggaactcgtt aatgcctggg aaaaggaatc gcggtatgca 240
gagagcaagc ctgggtctgc agggctgcgc gctcgtaggt cgtcgccatg cccgccggtt 300
gagggcccg cggggcgcca gcggcccctg tgtgcctccc gcagtcgcct gatccctgcg 360
ccccgcggag cgggtgctgt gcagcgggag aaggacctgt ccacctacaa ctggaactcc 420
ttcggcctgc gctacggcag gaggcaggcg gcgcgggcag cacggggc 468

```

<210> 7

<211> 130

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 7

```

Met Thr Ser Leu Ala Ser Trp Gln Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala
      5              10              15
Ser Phe Gly Glu Pro Leu Ala Lys Met Ala Pro Val Val Asn Pro Glu
      20              25              30
Pro Thr Gly Gln Gln Ser Gly Pro Gln Glu Leu Val Asn Ala Trp Gln
      35              40              45
Lys Gly Pro Arg Tyr Ala Glu Ser Lys Pro Gly Ala Ala Gly Leu Arg
      50              55              60
Ala Arg Arg Thr Ser Pro Cys Pro Pro Val Glu Asn Pro Thr Gly His
      65              70              75              80
Gln Arg Pro Pro Cys Ala Thr Arg Ser Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg
      85              90              95
Gly Ser Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Met Ser Ala Tyr Asn Trp
      100             105             110
Asn Ser Phe Gly Leu Arg Tyr Gly Arg Arg Gln Val Ala Arg Ala Ala
      115             120             125
Arg Gly
      130

```

<210> 8

<211> 390

<212> DNA

<213> Rattus sp.

5/13

<400> 8

```

atgacctcgc tggcttcttg gcagctgctg cttctcctct gtgtggcctc ttttggggag 60
ccactggcaa aaatggcacc tgttgtgaac cctgaaccca caggccaaca gtccggaccc 120
caggaactcg ttaatgcctg gcaaaagggc ccgcggtatg cagagagcaa gcctggggct 180
gcaggactgc gcgctcgccg aacatcgcca tgcccgcggg tggagaaccc cacggggcac 240
cagcggcccc cgtgtgccac ccgcagtcgc ctgatccctg cgcgccgcgg atcgggtgtg 300
gtgcagcgcg agaaggacat gtcagcctac aactggaact cctttggcct gcgctacggc 360
aggaggcagg tggcgcgggc ggcacggggc                                     390

```

<210> 9

<211> 398

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

```

Met His Thr Val Ala Thr Ser Gly Pro Asn Ala Ser Trp Gly Ala Pro
      5              10              15
Ala Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Ala Asn Ala Ser Asp Gly
      20              25              30
Pro Val Pro Ser Pro Arg Ala Val Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe
      35              40              45
Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile
      50              55              60
Tyr Val Ile Cys Arg His Lys Pro Met Arg Thr Val Thr Asn Phe Tyr
      65              70              75              80
Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val
      85              90              95
Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Gly Trp Val Leu Gly Asp
      100             105             110
Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala
      115             120             125
Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr
      130             135             140
Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu
      145             150             155             160
Ala Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro
      165             170             175
Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro Arg Ala Tyr Cys Ser

```


6/13

180	185	190
Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn		
195	200	205
Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr		
210	215	220
Ala Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Val Ala Val Arg Pro Ala Pro		
225	230	235
Ala Asp Ser Ala Leu Gln Gly Gln Val Leu Ala Glu Arg Ala Gly Ala		
245	250	255
Val Arg Ala Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe		
260	265	270
Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu		
275	280	285
Gly Pro Ala Gly Ser Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu		
290	295	300
Lys Thr Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro		
305	310	315
Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Arg Arg		
325	330	335
Val Cys Pro Cys Ala Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly		
340	345	350
Pro Ser Asp Pro Ala Ala Pro His Ala Glu Leu His Arg Leu Gly Ser		
355	360	365
His Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Lys Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ala		
370	375	380
Ala Arg Gly Leu Cys Val Leu Gly Glu Asp Asn Ala Pro Leu		
385	390	395

<210> 10

<211> 1194

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

atgcacaccg tggctacgtc cggacccaac gcgtcctggg gggcacccgc caacgcctcc	60
ggctgcccgg gctgtggcgc caacgcctcg gacggcccag tcccttcgcc gcgggcccgtg	120
gacgcctggc tcgtgccgct cttcttcgcg gcgtgatgc tgctgggcct ggtggggaac	180
tcgctggtca tctacgtcat ctgccgccac aagccgatgc ggaccgtgac caactttctac	240

7/13

```

atcgccaacc tggcggccac ggacgtgacc ttctctctgt gctgcgtccc cttcacggcc 300
ctgctgtacc cgctgcccgg ctgggtgctg ggcgacttca tgtgcaagtt cgtcaactac 360
atccagcagg tctcggtgca ggccacgtgt gccactctga ccgccatgag tgtggaccgc 420
tggtacgtga cgggtgttccc gttgcgcgcc ctgcaccgcc gcacgccccg cctggcgctg 480
gctgtcagcc tcagcatctg ggtaggctct gcggcgggtgt ctgcgcgggt gctcgccctg 540
caccgcctgt caccggggcc gcgcgcctac tgcagtgagg ccttccccag ccgcgcctg 600
gagcgcgcct tcgcactgta caacctgctg gcgctgtacc tgctgccgct gctcgccacc 660
tgcgctgct atgcggccat gctgcgccac ctgggcgggg tcgccgtgcg ccccgcgccc 720
gccgatagcg ccctgcaggg gcaggtgctg gcagagcgcg caggcgccgt gcgggccaag 780
gtctcgcggc tggtaggggc cgtggtcctg ctcttcgccg cctgctgggg ccccatccag 840
ctgttcttgg tgctgcaggc gctgggcccc gcgggctcct ggacccacg cagctacgcc 900
gcctacgcgc ttaagacctg ggctcactgc atgtcctaca gcaactccgc gctgaacccg 960
ctgctctacg ccttcctggg ctgcacttc cgacaggcct tccgcgcgt ctgccccctg 1020
gcgcgcgcc gccccgcgcg cccccgcgg cccggaccct cggacccgc agccccacac 1080
gcggagctgc accgcctggg gtcccacccg gcccccgcca gggcgagaa gccagggagc 1140
agtgggctgg ccgcgcgcgg gctgtgcgtc ctgggggagg acaacgcccc tctc 1194

```

<210> 11

<211> 396

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 11

```

Met Ala Ala Glu Ala Thr Leu Gly Pro Asn Val Ser Trp Trp Ala Pro
          5              10              15
Ser Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Val Asn Ala Ser Asp Gly
          20              25              30
Pro Gly Ser Ala Pro Arg Pro Leu Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe
          35              40              45
Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile
          50              55              60
Phe Val Ile Cys Arg His Lys His Met Gln Thr Val Thr Asn Phe Tyr
          65              70              75              80
Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val
          85              90              95
Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Asp
          100             105             110
Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala

```

8/13

115	120	125
Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr		
130	135	140
Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu		
145	150	155
Thr Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro		
165	170	175
Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro His Thr Tyr Cys Ser		
180	185	190
Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn		
195	200	205
Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr		
210	215	220
Gly Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Ala Ala Val Arg Pro Ala Pro		
225	230	235
Thr Asp Gly Ala Leu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Gln Arg Ala Gly Ala		
245	250	255
Val Arg Thr Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe		
260	265	270
Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu		
275	280	285
Gly Pro Ser Gly Ala Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu		
290	295	300
Lys Ile Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro		
305	310	315
Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Cys Arg		
325	330	335
Val Cys Pro Cys Gly Pro Gln Arg Gln Arg Arg Pro His Ala Ser Ala		
340	345	350
His Ser Asp Arg Ala Ala Pro His Ser Val Pro His Ser Arg Ala Ala		
355	360	365
His Pro Val Arg Val Arg Thr Pro Glu Pro Gly Asn Pro Val Val Arg		
370	375	380
Ser Pro Ser Val Gln Asp Glu His Thr Ala Pro Leu		
385	390	395

<210> 12

<211> 1188

9/13

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 12

```

atggccgcag aggcgcagtt gggtcggaac gtgagctggt gggctccgtc caacgcttcg    60
ggatgcccgg gctgcgggtgt caatgcctcg gatggcccag gctccgcgcc aaggcccctg   120
gatgcctggc tggtgcccct gtttttcgct gccctaattgt tgcctggggct agtcggggaac  180
tcactggtca tcttcgttat ctgccgccac aagcacatgc agaccgtcac caattttctac  240
atcgctaacc tggcggccac agatgtcact ttccttctgt gctgcgtacc cttcaccgcg   300
ctcctctatc cgctgcccac ctgggtgctg ggagacttca tgtgcaaatt cgtcaactac   360
atccagcagg tctcggtgca agccacatgt gccacttga cagccatgag tgtggaccgc   420
tggtacgtga ctgtgttccc gctgcgtgca cttcaccgcc gcactccgcg cctggcccctg   480
actgtcagcc ttagcatctg ggtgggttcc gcagctgttt ccgccccggt gctggctctg   540
caccgcctgt cggccgggcc tcacacctac tgcaagtagg cgtttcccag ccgtgccctg   600
gagcgcgctt tcgcgctcta caacctgctg gccctatacc tgctgccgct gctcgccacc   660
tgcgctgctt acggtgccat gctgcgccac ctgggcgcgc ccgctgtacg cccgcacccc   720
actgatggcg ccctgcaggg gcagctgcta gcacagcgcg ctggagcagt gcgcaccaag   780
gtctcccggc tggtgggcgc tgcgtcctg ctcttcgccg cctgctgggg cccgatccag   840
ctgttcctgg tgcctcaagc cctgggcccc tcgggggcct ggcaacctcg aagctatgcc   900
gcctacgcgc tcaagatctg ggctcactgc atgtcctaca gcaattctgc gctcaacccg   960
ctgctctatg ccttcctggg tccccacttc agacaggcct tctgccgcgt gtgcccctgc  1020
ggcccgcgca gccagcgtcg gcccacgcg tcagcgcact cggaccgagc cgcaccccat  1080
agtgtgccgc acagccgggc tgcgcacct gtccgggtca ggacccccga gcctggggaac  1140
cctgtggtgc gctcgccctc tgttcaggat gaacacactg ccccactc    1188

```

<210> 13

<211> 396

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

```

Met Ala Thr Glu Ala Thr Leu Ala Pro Asn Val Thr Trp Trp Ala Pro
 1             5             10             15
Ser Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Val Asn Ala Ser Asp Asp
      20             25             30
Pro Gly Ser Ala Pro Arg Pro Leu Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe
      35             40             45
Phe Ala Thr Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile

```

10/13

50	55	60
Tyr Val Ile Cys Arg His Lys His Met Gln Thr Val Thr Asn Phe Tyr		
65	70	75 80
Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val		
85	90	95
Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Ala Trp Val Leu Gly Asp		
100	105	110
Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala		
115	120	125
Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr		
130	135	140
Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu		
145	150	155 160
Ala Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro		
165	170	175
Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro Arg Thr Tyr Cys Ser		
180	185	190
Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn		
195	200	205
Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr		
210	215	220
Gly Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Ala Ala Val Arg Pro Ala Pro		
225	230	235 240
Thr Asp Gly Ala Leu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Gln Arg Ala Gly Ala		
245	250	255
Val Arg Thr Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe		
260	265	270
Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu		
275	280	285
Gly Pro Ser Gly Ala Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Val		
290	295	300
Lys Ile Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro		
305	310	315 320
Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Cys Arg		
325	330	335
Val Cys Pro Cys Cys Arg Gln Arg Gln Arg Arg Pro His Thr Ser Ala		
340	345	350
His Ser Asp Arg Ala Ala Thr His Thr Val Pro His Ser Arg Ala Ala		

11/13

355	360	365
His Pro Val Arg Ile Arg Ser Pro Glu Pro Gly Asn Pro Val Val Arg		
370	375	380
Ser Pro Cys Ala Gln Ser Glu Arg Thr Ala Ser Leu		
385	390	395

<210> 14

<211> 1188

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 14

```

atggccaccg aggcgacatt ggctcccaat gtgacctggt gggctccgtc caacgcttca   60
ggatgcccag gctgcgggtgt caacgcctcg gatgaccag gctctgcgcc aaggcccctg  120
gatgcctggc tggttcccct gtttttgcgt acactcatgt tgcttgggct ggtcggaaac  180
tcattggtca tctacgttat ctgccgccac aagcacatgc agacagtta caactttctac  240
atcgctaacc tggctgccac agacgtcaact ttctactgt gctgcgtgcc cttcaccgca  300
ctcctctacc cgctgccgcg ctgggtgctg ggagacttca tgtgcaaatt cgtcaactac  360
atccagcagg tctcggtgca agccacatgt gccactctga cggccatgag tgtggaccgc  420
tggtatgtga ctgtgttccc gctgcgtgca cttcaccgcc gcactccgcg cctggccctg  480
gctgtcagcc tcagcatctg ggtgggggtca gcagctgtgt cggccccggt gctggccctg  540
caccgcctgt cgccagggcc tcgcacctac tgcagcgagg cgtttcccag ccgcgcctg  600
gagcgcgcct tcgcgtcta caacctgctg gctctatata tgctgccgct gctcgccacc  660
tgcgctgct acggcgccat gctgcgccac ctgggcccgt cggctgtacg cccgcaccc  720
actgacggcg cctgcaggg acagctgcta gcacagcgcg cgggagcagt ggcaccaag  780
gtctcccggc tgggtggcgc tgcgtcctg ctcttcgcgc cctgctgggg ccgatccag  840
ctgttcctgg tgcttcaagc cctgggcccc tcgggggcct ggcaccctcg aagctatgcc  900
gcctacgcgg tcaagatctg ggctcactgc atgtcctaca gcaactcggc gctcaatccg  960
ctgctctatg cttcctggg ttcacacttc agacaggcct tctgccgcgt gtgcccctgc 1020
tgccggcaac gccagcgccg gccccacacg tcagcgcaact cggaccgagc tgcaactcac 1080
actgtgccgc acagccgtgc tgcgcacct gtgcggatca ggagcccgga gcctgggaac 1140
cctgtggtgc gctcgccctg cgctcagagt gaacgcactg cctcactc   1188

```

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

12/13

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH₂) form

<400> 15

Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 10 15

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH₂) form

<400> 16

Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH₂) form

<400> 17

Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 9

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide (-CONH₂) form

13/13

<400> 18

Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe

1 5 8

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

aaggacctgc cgaactacaa ctggaactcc ttcggcctgc gcttc 45

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

tacaactgga actccttcgg cctgcgcttc 30

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

aactggaact ccttcggcct gcgcttc 27

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

tggaactcct tcggcctgcg cttc 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16978

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07K14/47, A61K38/00, A61P1/18, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10,
A61P7/02, A61P9/10, A61P13/00, A61P15/00, A61P15/06, A61P15/08,
A61P25/28, A61P35/00, A61P35/04, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07K1/00-C07K19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/092829 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 21 November, 2002 (21.11.02), Full text & JP 2003-070488 A	2
A	WO 01/75104 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 11 October, 2001 (11.10.01), Full text & EP 1273658 A1 & JP 2001-340094 A	2
A	WO 00/24890 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 04 May, 2000 (04.05.00), Full text & EP 1126028 A1 & JP 2000-312590 A	2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 April, 2004 (22.04.04)Date of mailing of the international search report
11 May, 2004 (11.05.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16978

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Ringel, Matthew D. et al., Metastin Receptor is Overexpressed in Papillary Thyroid Cancer and Activates MAP Kinase in Thyroid Cancer Cells., J.Clin.Endocrinol.Metab., Vol.87, No.5, May, 2002, pages 2399 to 2402	2
A	Masato Kotani et al., The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54., J.Biol.Chem., Vol.276, No.37, 2001, pages 34631 to 34636	2
A	Sang-Kyou Han et al., Orphan G Protein-coupled receptors MrgA1 and MrgC11 are distinctively activated by RF-amide-related peptides through the G $\alpha_{q/11}$ pathway., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.99, No.23, November 2002, pages 14740 to 14745	2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16978

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16978

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 16-26 and 42-44.

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions claimed in claims 16-26 and 42-44 pertain to "method for treatment and diagnosis of a human body by surgery or therapy" and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. ☒ Claims Nos.: 1, 3-15 and 27-37

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Only a few examples of metastatin derivatives represented by a broad formula shown in claim 1 are described in the description. Thus, claim 1 is not satisfactorily supported by the description and, even if common technical (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 2.

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16978

Continuation of Box No. II-2, of continuation of first sheet(2)

knowledge at the filing date of this application is taken into account, is not satisfactorily disclosed therein. Consequently, no meaningful search can be carried out on the invention claimed in claim 1. This applies to claims 3-15 and 27-37 quoting claim 1.

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet(2)

Independent claim 2 relates to a metastatin derivative represented by the chemical formula specified in this application.

The matter common to independent claims 38-41 and 45-47 relates to a metastatin receptor agonist.

However, as a result of search, it has become apparent that this metastatin receptor agonist is disclosed in Ringel, Matthew D., et. al., Metastatin Receptor is Overexpressed in Papillary Thyroid Cancer and Activates MAP Kinase in Thyroid Cancer Cells., J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol. 87, No. 5, May 2002, pp2399-2402 and hence is not novel.

As a result, the metastatin receptor agonist falls within the category of prior art, and hence this common matter is not special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence.

Therefore, there is no matter common to independent claims 38-41 and 45-47.

Further, as in the independent claims 2, 38-41 and 45-47, there exists no other common matter considered as special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, any technical relationship within the meaning of PCT Rule 13 cannot be found between the different inventions.

In summing up, it is apparent that the independent claims 2, 38-41 and 45-47 do not satisfy the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl ⁷ CO7K14/47, A61K38/00, A61P1/18, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, A61P7/02, A61P9/10, A61P13/00, A61P15/00, A61P15/06, A61P15/08, A61P25/28, A61P35/00, A61P35/04, A61P43/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl ⁷ CO7K1/00-CO7K19/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 02/092829 A1 (武田薬品工業株式会社), 2002. 11. 21, 文献全体 &JP 2003-070488 A	2
A	WO 01/75104 A1 (武田薬品工業株式会社), 2001. 10. 11, 文献全体 &EP 1273658 A1 &JP 2001-340094 A	2
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 22. 04. 2004	国際調査報告の発送日 11. 5. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JJP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 耕一郎 電話番号 03-3581-1101 内線 3446	4B 9636

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/24890 A1 (武田薬品工業株式会社), 2000. 05. 04, 文献全体 &EP 1126028 A1 &JP 2000-312590 A	2
A	Ringel, Matthew D., et al., Metastin Receptor is Overexpressed in Papillary Thyroid Cancer and Act ivates MAP Kinase in Thyroid Cancer Cells. J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol.87, No.5, May 2002, pp2399-2402	2
A	Masato Kotani, et al., The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natu ral Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. J. Biol. Chem., Vol.276, No.37, 2001, pp34631-34636	2
A	Sang-Kyou Han, et al., Orphan G Protein-coupled receptors MrgA1 and MrgC11 are distinctive ly activated by RF-amide-related peptides through the G $\alpha_{q/11}$ pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.99, No.23, Nov. 2002, pp14740-14745	2

第 I 欄 ニュクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 16-26, 42-44 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 16-26、42-44 に記載されている発明は、「人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法」に関するものであるから、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 1, 3-15, 27-37 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、請求の範囲 1 に記載の広範な構造式で表されたメタスチン誘導体として、明細書には具体的なものが数例記載されているのみである。よって、請求の範囲 1 は明細書による裏付けを欠き、また出願時の技術常識を勘案しても、開示を欠いている。よって、請求の範囲 1 に記載された発明について、有意義な調査ができない。請求の範囲 1 を引用する請求の範囲 3-15、27-37 も同様である。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 2

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅲ欄の続き

独立した請求の範囲2は、本願所定の化学構造式で表されるメタスチン誘導体に関するものである。

独立した請求の範囲38-41、45-47に共通の事項は、メタスチン受容体アゴニストに関するものである。

しかしながら、調査の結果、当該メタスチン受容体アゴニストは、Ringel, Matthew D., et al., Metastin Receptor is Overexpressed in Papillary Thyroid Cancer and Activates MAP Kinase in Thyroid Cancer Cells., J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol.87, No.5, May 2002, pp2399-2402に開示されているから、新規でないことが明らかになった。

結果として、当該メタスチン受容体アゴニストは先行技術の域を出ていないから、PCT規則13.2の第2文の意味においてこの共通事項は特別な技術的特徴ではない。

したがって、独立した請求の範囲38-41、45-47において共通の事項はない。

また、独立した請求の範囲2、38-41、45-47において、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことができない。

よって、独立した請求の範囲2、38-41、45-47は、発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。

trans.



US 20060241051A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2006/0241051 A1**

Kitada et al. (43) **Pub. Date: Oct. 26, 2006**

(54) **METASTIN DERIVATIVES AND USE
THEREOF**

(76) **Inventors:** Chieko Kitada, Osaka (JP); Taiji
Asami, Ibaraki (JP); Naoki Nishizawa,
Ibaraki (JP); Tetsuya Ohtaki, Ibaraki
(JP); Naoki Tarui, Osaka (JP);
Hirokazu Matsumoto, Ibaraki (JP);
Jiro Noguchi, Ibaraki (JP); Hisanori
Matsui, Ibaraki (JP)

Correspondence Address:
EDWARDS & ANGELL, LLP
P.O. BOX 55874
BOSTON, MA 02205 (US)

(21) **Appl. No.: 10/540,494**

(22) **PCT Filed: Dec. 26, 2003**

(86) **PCT No.: PCT/JP03/16978**

(30) **Foreign Application Priority Data**

Dec. 26, 2002 (JP) 2002-377179

Publication Classification

(51) **Int. Cl.**
A61K 38/10 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
(52) **U.S. Cl.** **514/15; 530/328**

(57) **ABSTRACT**

The present invention provides a metastin derivative in which the amino acids comprising metastin were modified by alternative chemical substituents resulting in metastin derivatives, having excellent blood stability and exhibiting cancer metastasis inhibiting action or cancer growth inhibiting action.

FIG 1

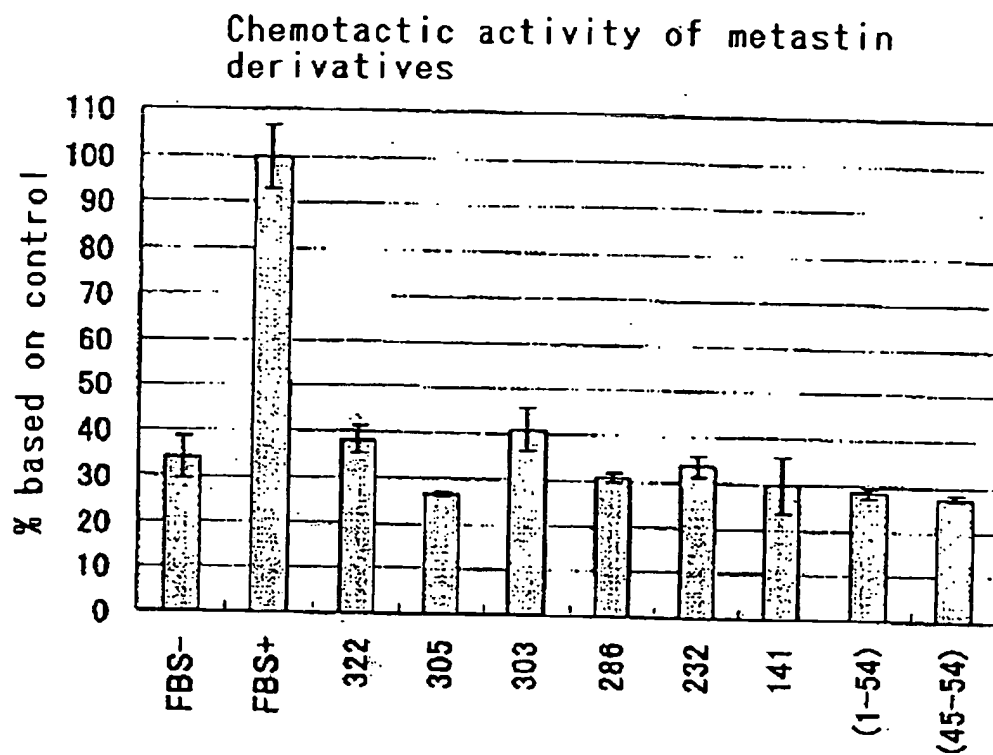


FIG 2

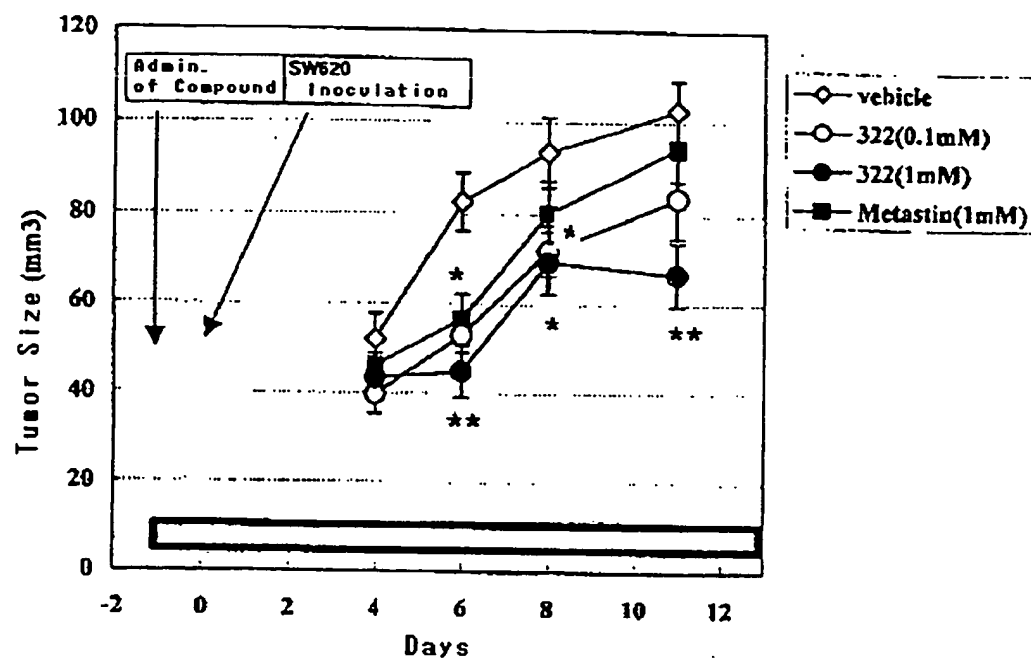


FIG 3

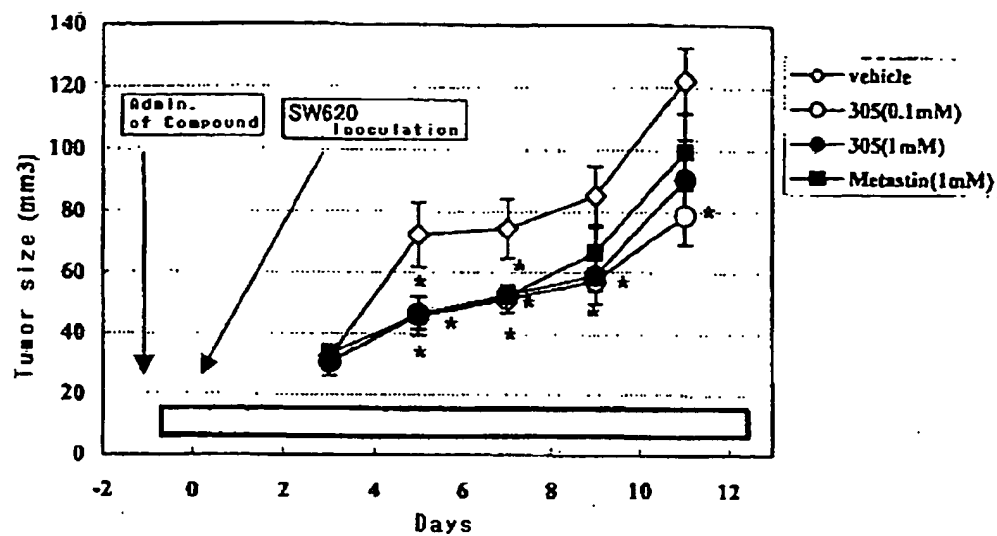


FIG 4

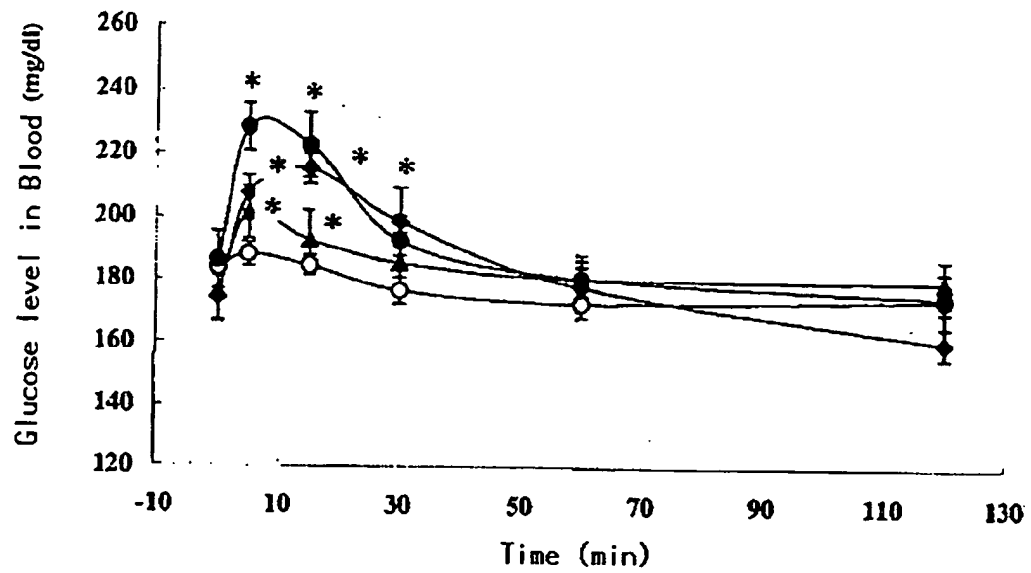


FIG 5

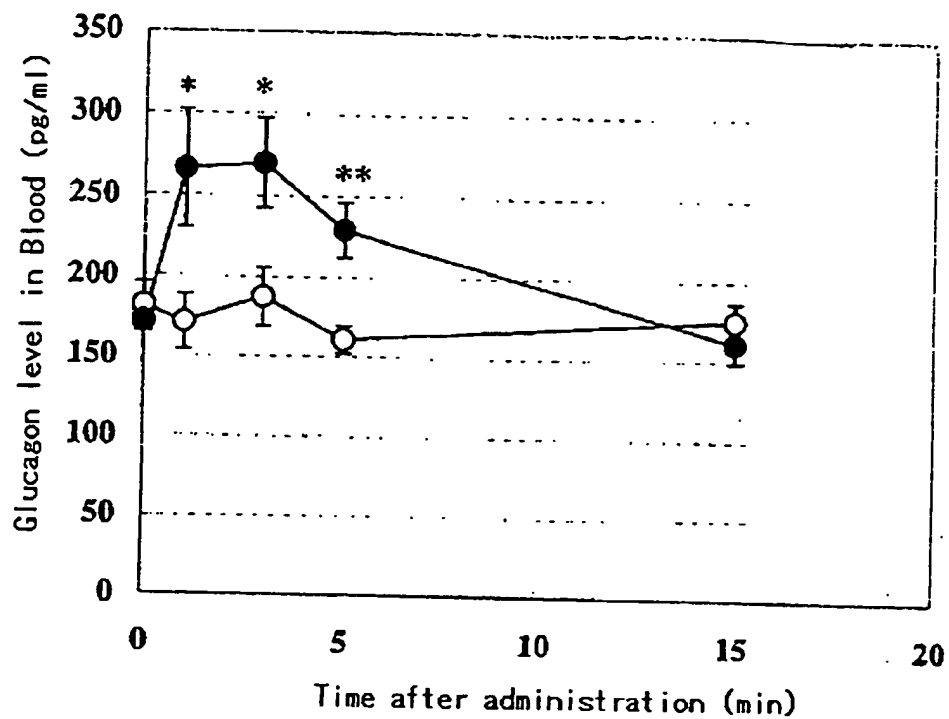


FIG 6

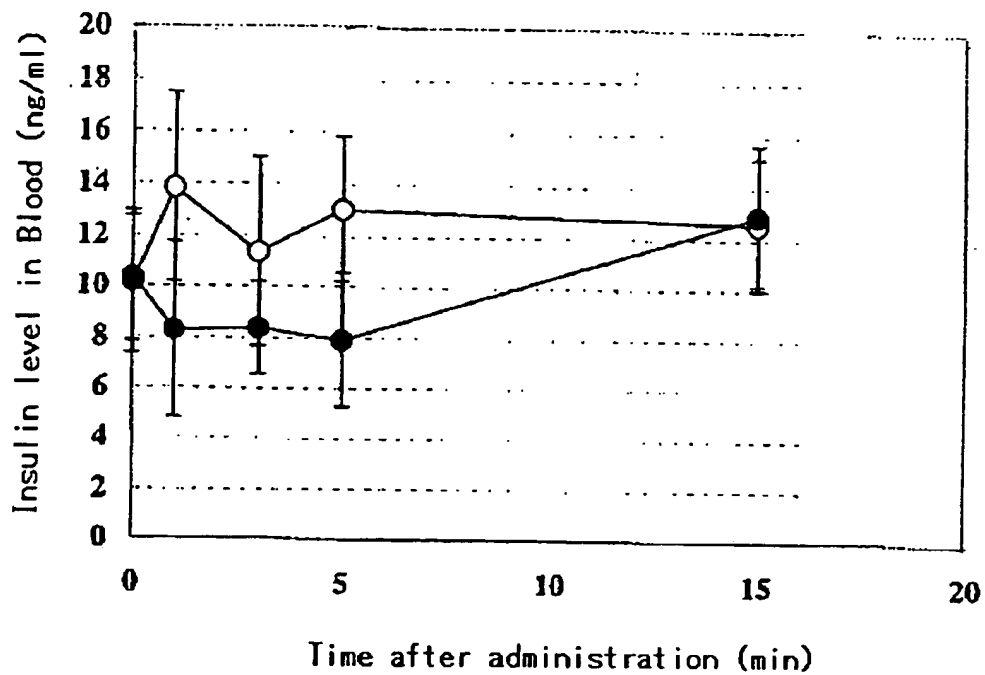


FIG 7

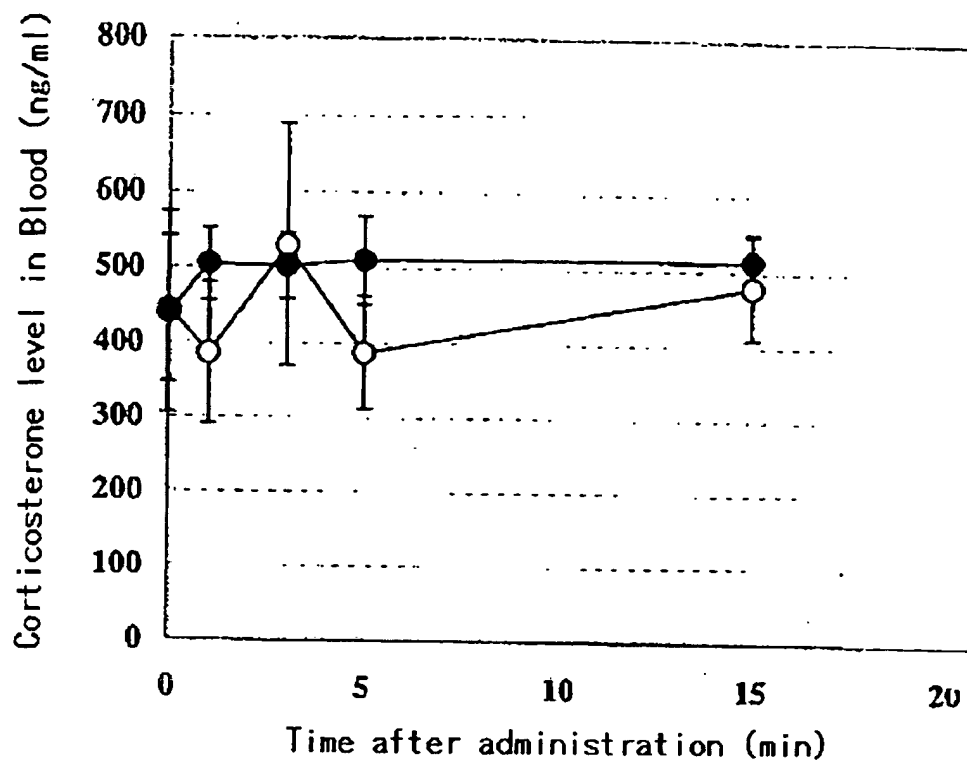


FIG 8

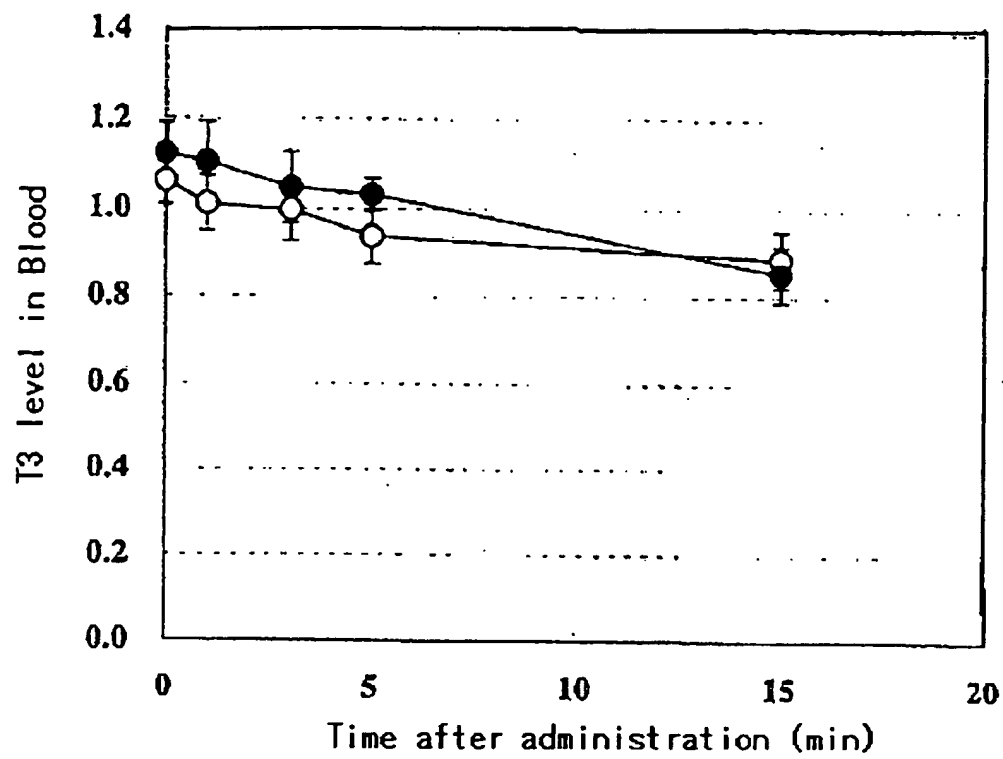


FIG 9

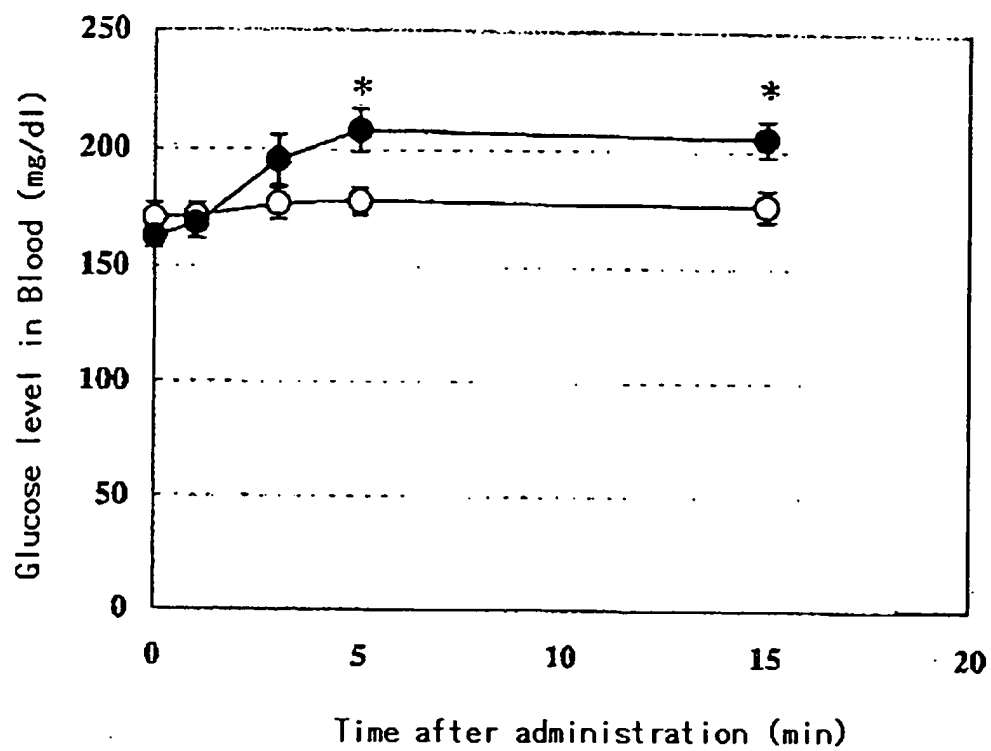


FIG 10

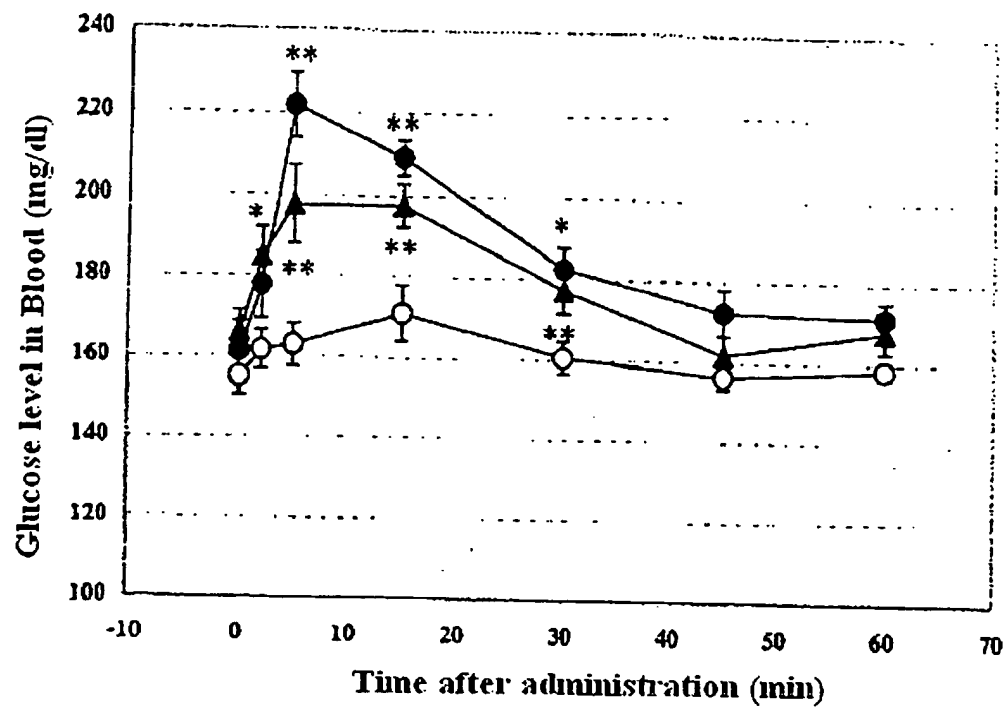


FIG 11

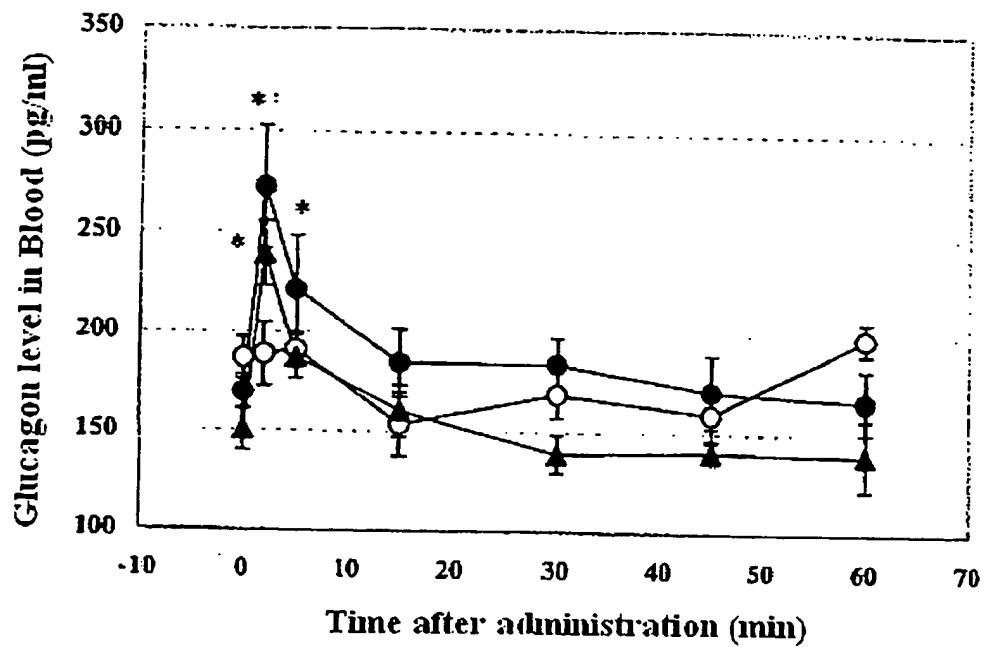


FIG 12

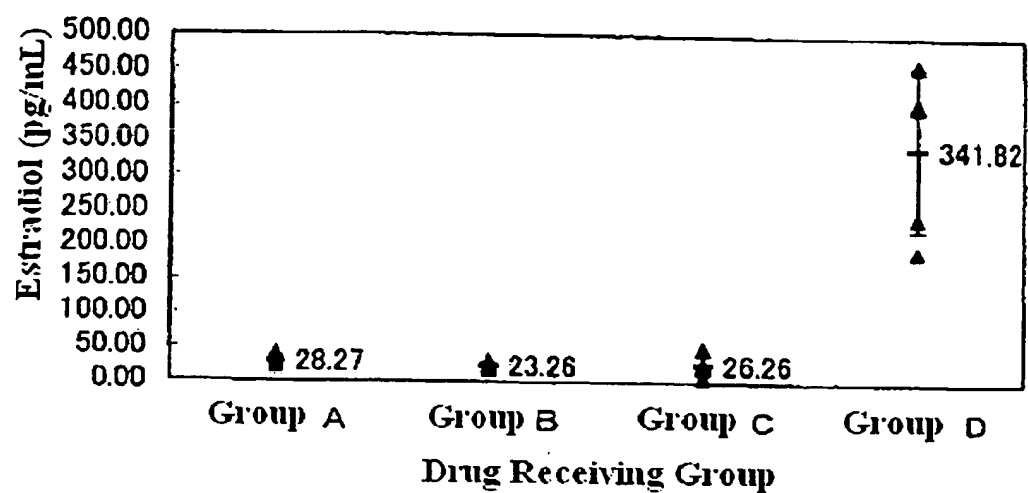


FIG 13

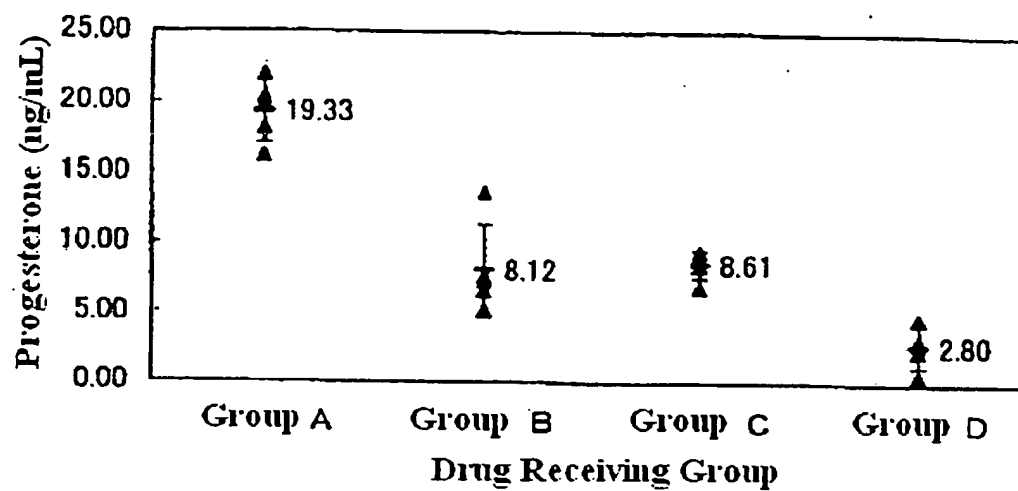


FIG 14

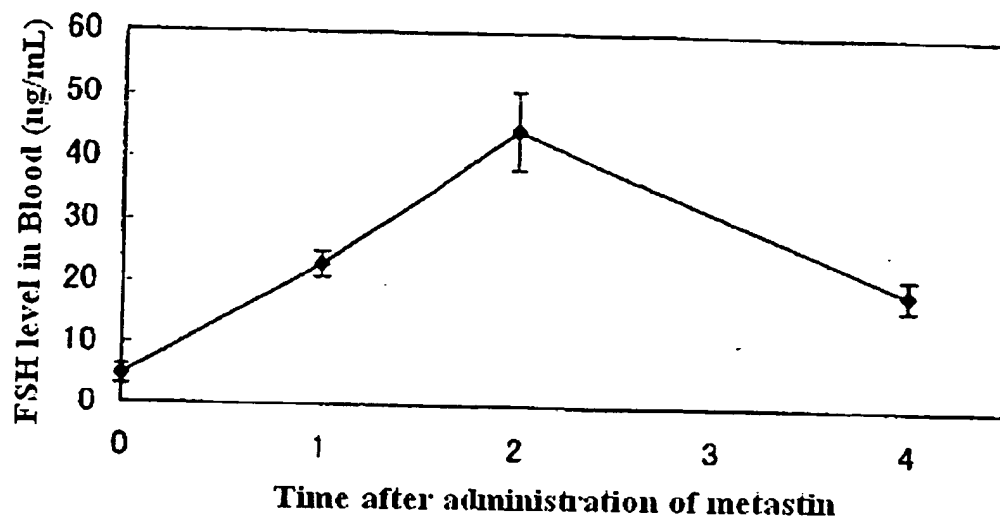


FIG 15

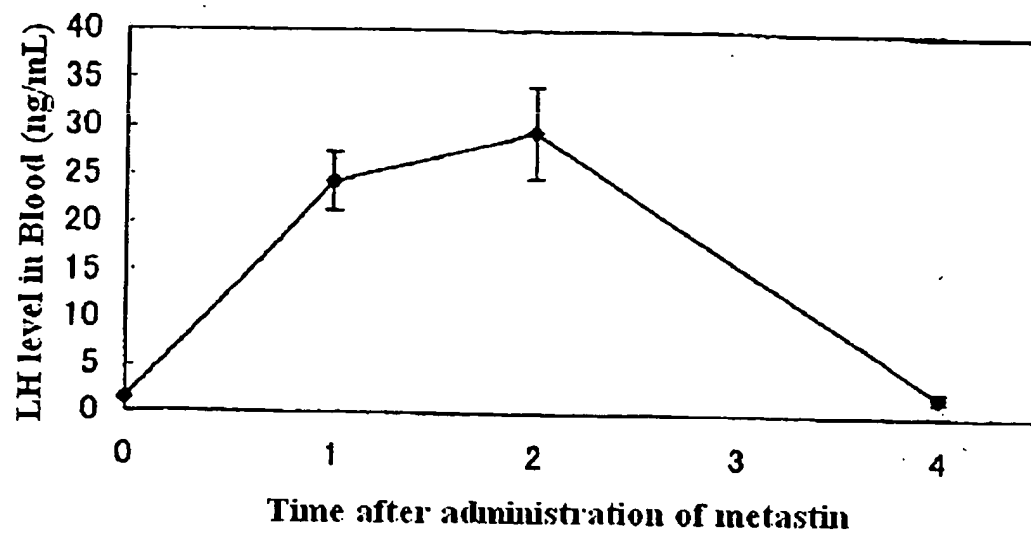


FIG 16

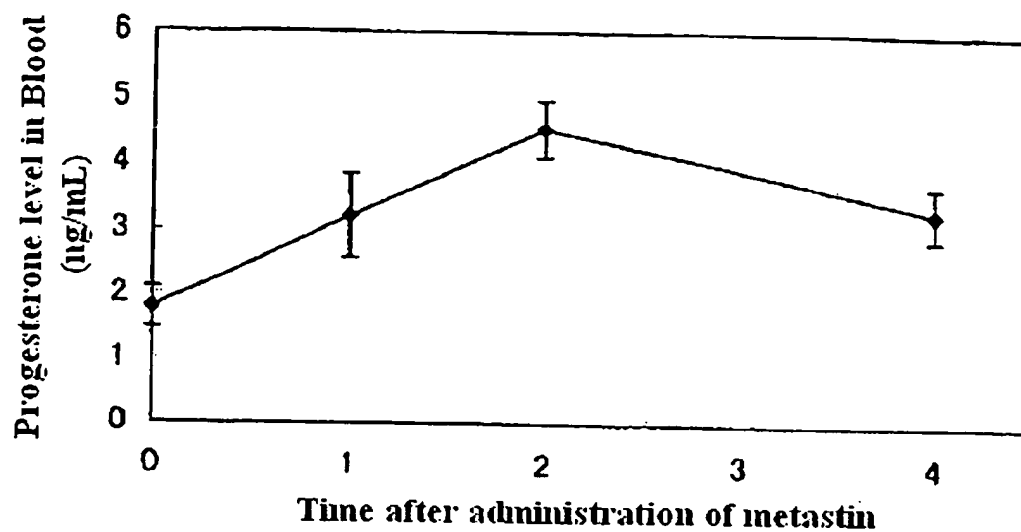


FIG 17

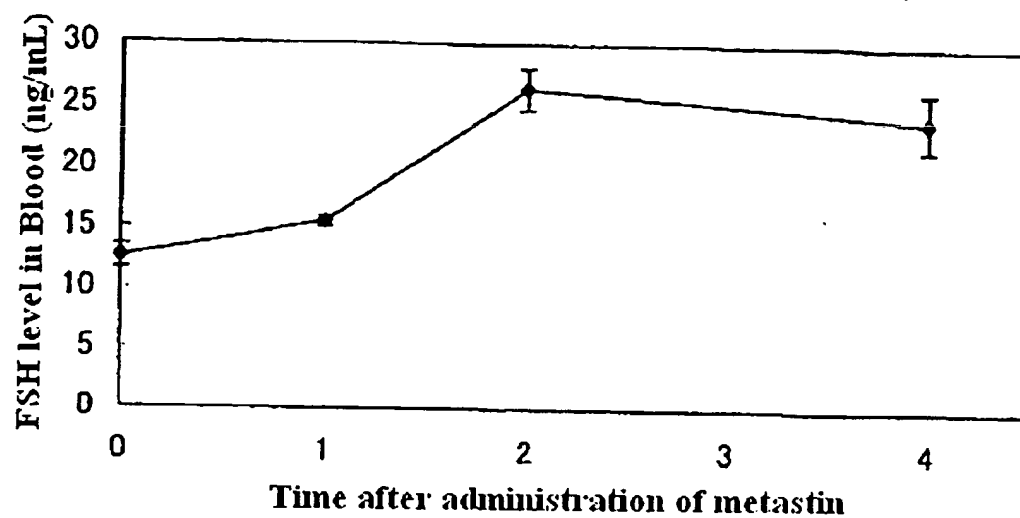


FIG 18

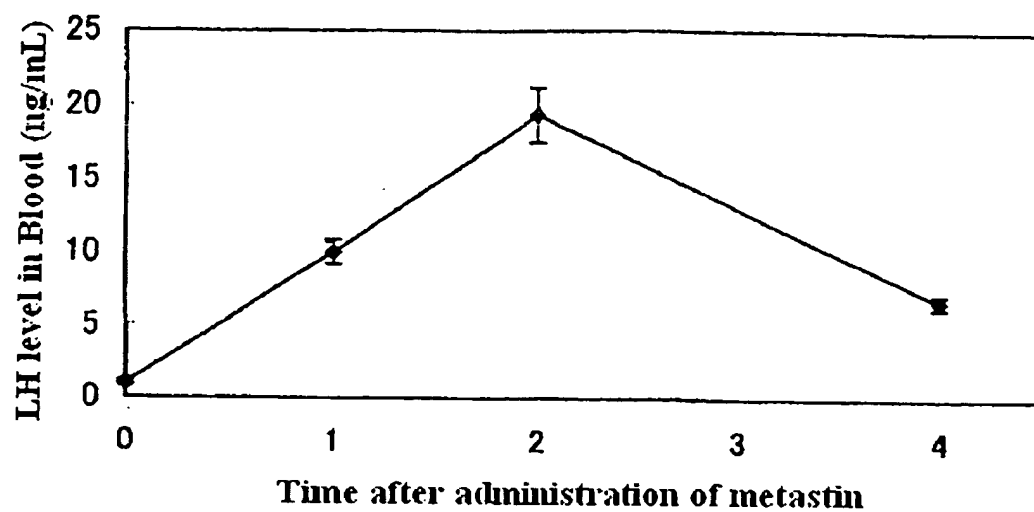


FIG 19

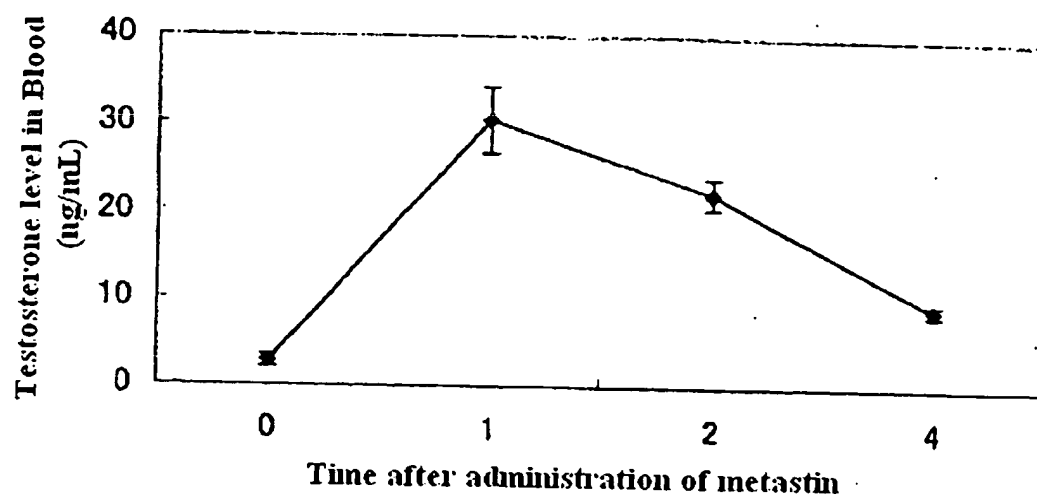


FIG 20

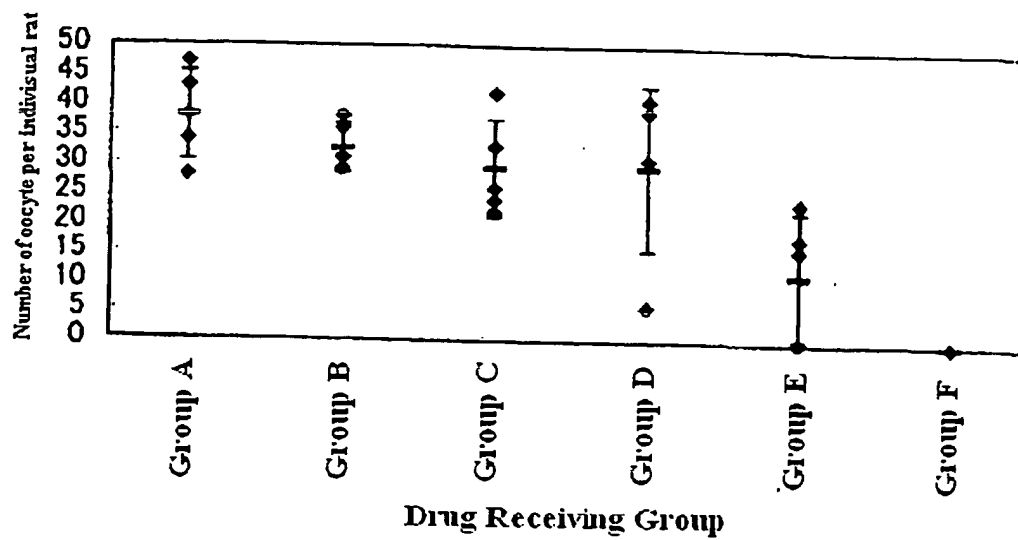


FIG 21

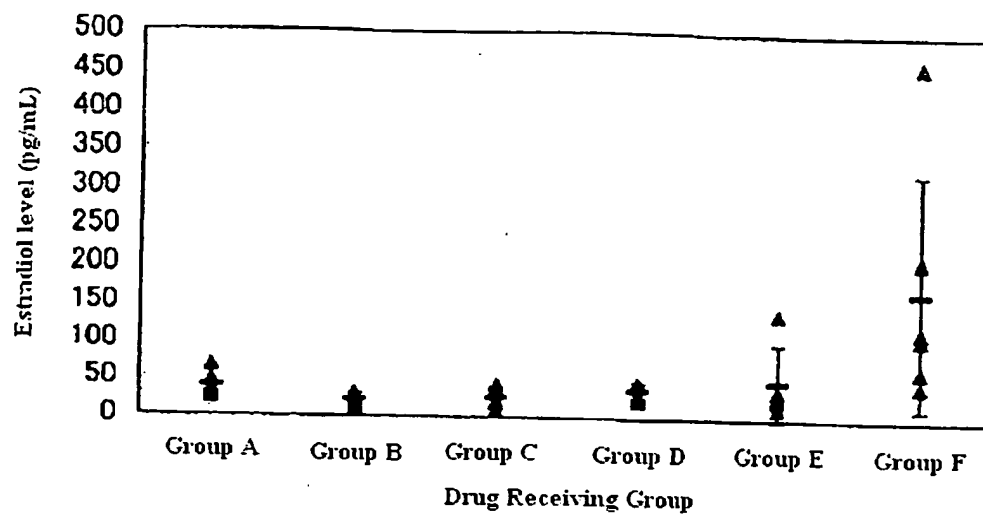
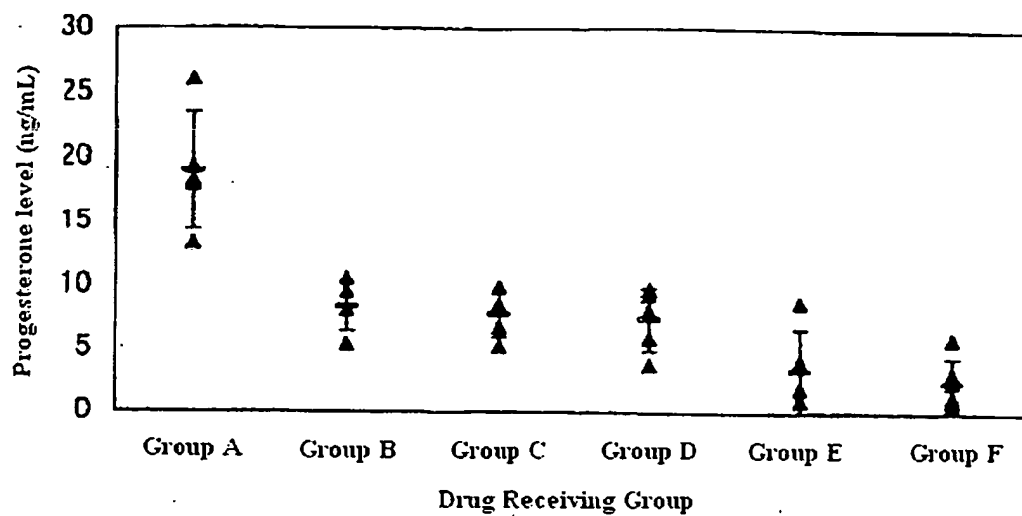


FIG 22



METASTIN DERIVATIVES AND USE THEREOF

TECHNICAL FIELD

[0001] The present invention relates to metastin derivatives and use thereof.

BACKGROUND ART

[0002] Human-derived metastin (also termed KiSS-1 peptide) (WO 00/24890) and mouse or rat-derived metastin (WO 01/75104 2) are known. Also, sustained released preparations containing metastin are known (WO 02/85399).

[0003] Reportedly, metastin has an effect of suppressing cancer metastasis and is therefore effective for preventing/treating cancers (for example, lung cancer, gastric cancer, liver cancer, pancreatic cancer, colorectal cancer, rectal cancer, colonic cancer, prostate cancer, ovarian cancer, cervical cancer, breast cancer, renal cancer, bladder cancer, brain tumor, etc.); metastin also has an effect of regulating a function of the pancreas and is effective for preventing/treating pancreatic diseases (e.g., acute or chronic pancreatitis, pancreatic cancer, etc.); and metastin further has an effect of regulating a function of the placenta and is effective for preventing/treating choriocarcinoma, hydatid moles, invasive moles, miscarriage, fetal hypoplasia, sugar dysbolism, lipid dysbolism or abnormal delivery (WO00/24890; WO01/75104 2; WO 02/85399).

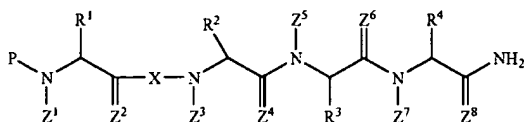
DISCLOSURE OF THE INVENTION

[0004] The present invention aims at providing stable metastin derivatives having excellent biological activities such as a cancer metastasis suppressing activity, and a cancer proliferation suppressing activity, etc.

[0005] The present inventors have made extensive studies to solve the foregoing problems. As a result, the inventors have found that by modifying the metastin-constituting amino acids with a specific modifying group, metastin derivatives unexpectedly show improved blood stability, etc. as compared to native metastin and exhibit an excellent cancer metastasis suppressing activity or a cancer proliferation suppressing activity. In addition, the inventors have found that unexpectedly, these metastin derivatives have an effect of suppressing gonadotropic hormone secretion, an effect of suppressing sex hormone secretion, etc., which are totally different from the effects known so far. Based on these findings, the inventors have continued further investigations and come to accomplish the present invention.

[0006] That is, the present invention provides the following features.

[0007] [1] A metastin derivative represented by formula (1):



[wherein,

[0008] each of Z^1 , Z^3 , Z^5 and Z^7 represents hydrogen atom or a C_{1-3} alkyl group; each of Z^2 , Z^4 , Z^6 and Z^8 represents hydrogen atom, O or S;

[0009] R^1 represents (1) hydrogen atom, or (2) a C_{1-8} alkyl group optionally substituted with a substituent selected from the group consisting of an optionally substituted carbamoyl group, an optionally substituted hydroxyl group and an optionally substituted aromatic cyclic group;

[0010] R^2 represents (1) hydrogen atom or (2) a cyclic or linear C_{1-10} alkyl group, or (3) a C_{1-10} alkyl group consisting of a cyclic alkyl group and a linear alkyl group;

[0011] R^3 represents:

[0012] (1) a C_{1-8} alkyl group having an optionally substituted basic group and optionally having an additional substituent,

[0013] (2) an aralkyl group having an optionally substituted basic group and optionally having an additional substituent,

[0014] (3) a C_{1-4} alkyl group having a non-aromatic cyclic hydrocarbon group of carbon atoms not greater than 7 having an optionally substituted basic group, and optionally having an additional substituent, or,

[0015] (4) a C_{1-4} alkyl group having a non-aromatic heterocyclic group of carbon atoms not greater than 7 having an optionally substituted basic group, and optionally having an additional substituent;

[0016] R^4 represents a C_{1-4} alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent selected from the group consisting of:

[0017] (1) an optionally substituted C_{6-12} aromatic hydrocarbon group,

[0018] (2) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

[0019] (3) an optionally substituted C_{8-14} aromatic fused-ring group,

[0020] (4) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

[0021] (5) an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7, and,

[0022] (6) an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7;

[0023] X represents a group shown by formula: $-\text{NHCH}(\text{Q}^1)\text{YQ}^2\text{C}(=\text{Z}^9)-$ (wherein, Q^1 represents a C_{1-4} alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent selected from the group consisting of:

[0024] (1) an optionally substituted C_{6-12} aromatic hydrocarbon group,

[0025] (2) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

[0026] (3) an optionally substituted C₈₋₁₄ aromatic fused-ring group,

[0027] (4) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

[0028] (5) an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7, and,

[0029] (6) an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7;

[0030] Q² represents (1) CH₂, which may optionally be substituted with a C₁₋₄ alkyl group optionally substituted with a substituent selected from the group consisting of carbamoyl group and hydroxyl group, (2) NH, which may optionally be substituted with a C₁₋₄ alkyl group optionally substituted with a substituent selected from the group consisting of carbamoyl group and hydroxyl group, or (3) o;

[0031] Y represents a group shown by formula:
—CONH—, —CSNH—, —CH₂NH—, —NHCO—,
—CH₂O—, —CH₂S— or —CH₂CH₂—, which may optionally be substituted with a C₁₋₆ alkyl group; and,

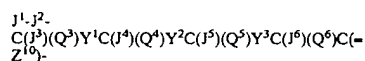
[0032] Z⁹ represents hydrogen atom, O or S; and,

[0033] P represents:

[0034] (1) hydrogen atom;

[0035] (2) an optional amino acid residue continuously or discontinuously bound from the C-terminal end of the 1-48 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1;

[0036] (3) a group represented by formula:



[0037] (wherein,

[0038] J¹ represents (a) hydrogen atom or (b) (i) a C₁₋₁₅ acyl group, (ii) a C₁₋₁₅ alkyl group, (iii) a C₆₋₁₄ aryl group, (iv) a carbamoyl group, (v) a carboxyl group, (vi) a sulfinio group, (vii) an amidino group or (viii) a glyoxyloyl group, which group may optionally be substituted with (a) hydrogen atom, or (b) a substituent containing an optionally substituted cyclic group;

[0039] J² represents (1) NH optionally substituted with a C₁₋₆ alkyl group,

[0040] (2) CH₂ optionally substituted with a C₁₋₆ alkyl group, (3) O or (4) S;

[0041] each of J³ through J⁶ represents hydrogen atom or a C₁₋₃ alkyl group;

[0042] each of Q³ through Q⁶ represents a C₁₋₄ alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent selected from the group consisting of:

[0043] (1) an optionally substituted C₆₋₁₂ aromatic hydrocarbon group,

[0044] (2) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

[0045] (3) an optionally substituted C₈₋₁₄ aromatic fused-ring group,

[0046] (4) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

[0047] (5) an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7,

[0048] (6) an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7,

[0049] (7) an optionally substituted amino group,

[0050] (8) an optionally substituted guanidino group,

[0051] (9) an optionally substituted hydroxyl group,

[0052] (10) an optionally substituted carboxyl group,

[0053] (11) an optionally substituted carbamoyl group, and

[0054] (12) an optionally substituted sulfhydryl group, or hydrogen atom;

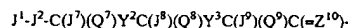
[0055] J³ and Q³, J⁴ and Q⁴, J⁵ and Q⁵ or J⁶ and Q⁶ may be combined together, or, J² and Q³, Y¹ and Q⁴, Y² and Q⁵, or Y³ and Q⁶ may be combined together, to form a ring;

[0056] each of Y¹ through Y³ represents a group represented by formula:

[0057] —CON(J¹³)—, —CSN(J¹³)—, —C(J¹⁴)N(J¹³)— or —N(J¹³)CO— (wherein each of J¹³ and J¹⁴ represents hydrogen atom or a C₁₋₃ alkyl group); and,

[0058] Z¹⁰ represents hydrogen atom, O or S);

[0059] (4) a group represented by formula:



[0060] (wherein,

[0061] J¹ and J² have the same significance as described above;

[0062] J⁷ through J⁹ have the same significance as J³;

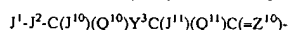
[0063] Q⁷ through Q⁹ have the same significance as Q³;

[0064] Y² and Y³ have the same significance as described above;

[0065] Z¹⁰ has the same significance as described above;

[0066] J⁷ and Q⁷, J⁸ and Q⁸ or J⁹ and Q⁹ may be combined together, or, J² and Q⁷, Y² and Q⁸ or Y³ and Q⁹ may be combined together, to form a ring);

[0067] (5) a group represented by formula:



[0068] (wherein,

[0069] J¹ and J² have the same significance as described above represents;

[0070] J¹⁰ and J¹¹ have the same significance as J³;

[0071] Q¹⁰ and Q¹¹ have the same significance as Q³;

[0072] Y³ has the same significance as described above;

[0073] Z¹⁰ has the same significance as described above; and,

[0074] J¹⁰ and Q¹⁰ or J¹¹ and Q¹¹ may be combined together, or J² and Q¹⁰ or Y³ and Q¹¹ may be combined together, to form a ring;

[0075] (6) a group represented by formula: J¹-J²-C(J¹²)(Q¹²)C(=Z¹⁰)-

[0076] (wherein,

[0077] J¹ and J² have the same significance as described above;

[0078] J¹² has the same significance as J³;

[0079] Q¹² has the same significance as Q³;

[0080] Z¹⁰ has the same significance as described above; and,

[0081] J¹² and Q¹² may be combined together, or J² and Q¹² may be combined together, to form a ring); or,

[0082] (7) a group represented by formula: J¹- (wherein, J¹ has the same significance as described above)] (provided that a peptide consisting of the amino acid sequence of 1-54, 2-54, 3-54, 4-54, 5-54, 6-54, 7-54, 8-54, 9-54, 10-54, 11-54, 12-54, 13-54, 14-54, 15-54, 16-54, 17-54, 18-54, 19-54, 20-54, 21-54, 22-54, 23-54, 24-54, 25-54, 26-54, 27-54, 28-54, 29-54, 30-54, 31-54, 32-54, 33-54, 34-54, 35-54, 36-54, 37-54, 38-54, 39-54, 40-54, 41-54, 42-54, 43-54, 44-54, 45-54, 46-54, 47-54, 48-54 or 49-54 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 is excluded), or a salt thereof.

[0083] [2] The metastin derivative (1) according to claim 1 or a salt thereof, which is:

- (i) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 141)
- (ii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂, (Compound No. 174)
- (iii) 3-(3-Indolyl)propionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 260)
- (iv) 3-Phenylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 269)
- (v) 2-(indol-3-yl)ethylcarbamoyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 279)
- (vi) D-Tyr-Asn-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 286)
- (vii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheΨ(CSNH)Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 296)
- (viii) TyrΨ(CH₂NH)Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 300)

-continued

- (ix) D-Tyr-D-Asn-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 303)
- (x) D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 305)
- (xi) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe(4F)-NH₂, (Compound No. 318)
- (xii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheΨ(NHCO)Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 319)
- (xiii) 3-Pyridylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 322)
- (xiv) 4-Imidazoleacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂, (Compound No. 323)
- (xv) D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂, or (Compound No. 385)
- (xvi) D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂, (Compound No. 386)

[0084] [3] A prodrug of the metastin derivative (1) according to (1) or a salt thereof.

[0085] [4] A pharmaceutical comprising the metastin derivative (1) according to (1) or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0086] [5] The pharmaceutical according to [4], which is an agent for suppressing cancer metastasis or an agent for suppressing cancer proliferation.

[0087] [6] The pharmaceutical according to [4], which is an agent for preventing/treating cancer.

[0088] [7] The pharmaceutical according to [4], which is an agent for regulating a function of the pancreas.

[0089] [8] The pharmaceutical according to [4], which is an agent for preventing/treating acute or chronic pancreatitis or pancreatic cancer.

[0090] [9] The pharmaceutical according to [4], which is an agent for regulating a function of the placenta.

[0091] [10] The pharmaceutical according to [4], which is an agent for preventing/treating choriocarcinoma, hydatid mole, invasive mole, miscarriage, fetal hypoplasia, abnormal glucose metabolism, abnormal lipid metabolism or labor induction.

[0092] [11] The pharmaceutical according to [4], which is an agent for improving gonadal function.

[0093] [12] The pharmaceutical according to [4], which is an agent for preventing/treating hormone-dependent cancer (e.g., prostate cancer, breast cancer), infertility, endometriosis or myoma of the uterus.

[0094] [13] The pharmaceutical according to [4], which is an agent for inducing or stimulating ovulation.

[0095] [14] The pharmaceutical according to [4], which is a gonadotropic hormone secretagogue agent or a sex hormone secretagogue agent.

[0096] [15] The pharmaceutical according to [4], which is an agent for preventing/treating Alzheimer's disease or mild cognitive impairment.

[0097] [16] A method for suppressing cancer metastasis or cancer proliferation, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0098] [17] A method for preventing/treating cancer, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0099] [18] A method for regulating a function of the pancreas, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0100] [19] A method for preventing/treating acute or chronic pancreatitis or pancreatic cancer, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0101] [20] A method for regulating a function of the placenta, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0102] [21] A method for preventing/treating choriocarcinoma, hydatid mole, invasive mole, miscarriage, fetal hypoplasia, abnormal glucose metabolism, abnormal lipid metabolism or labor induction, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0103] [22] A method for improving gonadal function, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0104] [23] A method for preventing/treating hormone-dependent cancer (e.g., prostate cancer, breast cancer), infertility, endometriosis or myoma of the uterus, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0105] [24] A method for inducing or stimulating ovulation, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0106] [25] A method for promoting gonadotropic hormone secretion or promoting sex hormone secretion, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0107] [26] A method for preventing/treating Alzheimer's disease or mild cognitive impairment, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0108] [27] Use of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for suppressing cancer metastasis or an agent for suppressing cancer proliferation.

[0109] [28] Use of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for preventing/treating cancer.

[0110] [29] Use of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for regulating a function of the pancreas.

[0111] [30] Use of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for preventing/treating acute or chronic pancreatitis or pancreatic cancer.

[0112] [31] Use of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for regulating a function of the placenta.

[0113] [32] Use of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for preventing/treating choriocarcinoma, hydatid mole, invasive mole, miscarriage, fetal hypoplasia, abnormal glucose metabolism, abnormal lipid metabolism or labor induction.

[0114] [33] Use of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for improving gonadal function.

[0115] [34] Use of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for preventing/treating hormone-dependent cancer (e.g., prostate cancer, breast cancer), infertility, endometriosis or myoma of the uterus.

[0116] [35] Use of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for inducing or stimulating ovulation.

[0117] [36] Use of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture a gonadotropic hormone secretagogue agent or a sex hormone secretagogue agent.

[0118] [37] Use of the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for preventing/treating Alzheimer's disease or mild cognitive impairment.

[0119] [38] A pancreatic glucagon secretagogue agent, comprising an agonist for a metastin receptor.

[0120] [39] An agent for promoting urine formation, comprising an agonist for a metastin receptor.

[0121] [40] An agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity, comprising an agonist for a metastin receptor.

[0122] [41] The agent according to [38] through [40], wherein the agonist for a metastin receptor is the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof.

[0123] [42] A method for promoting pancreatic glucagon secretion, which comprises administering to a mammal an effective dose of the agonist for a metastin receptor.

[0124] [43] A method for promoting urine formation, which comprises administering to a mammal an effective dose of the agonist for a metastin receptor.

[0125] [44] A method for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity, which comprises administering to a mammal an effective dose of the agonist for a metastin receptor.

[0126] [45] Use of the agonist for a metastin receptor to manufacture a pancreatic glucagon secretagogue agent.

[0127] [46] Use of the agonist for a metastin receptor to manufacture an agent for promoting urine formation.

and,

[0128] [47] Use of the agonist for a metastin receptor to manufacture an agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity.

[0129] The present invention further provides the following features.

[1] A hyperglycemic agent, comprising metastin or a salt thereof.

[2] A pancreatic glucagon secretagogue agent, comprising metastin or a salt thereof.

[3] An agent for promoting urine formation, comprising metastin or a salt thereof.

[0130] [4] An agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity, comprising metastin or a salt thereof.

[5] A hyperglycemic agent, comprising a DNA comprising a DNA encoding metastin.

[6] A pancreatic glucagon secretagogue agent, comprising a DNA comprising a DNA encoding metastin.

[7] An agent for promoting urine formation, comprising a DNA comprising a DNA encoding metastin.

[0131] [8] An agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity, comprising a DNA comprising a DNA encoding metastin.

[0132] [9] A diagnostic agent for obesity, hyperlipemia, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic

nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders, lipotoxicity, diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, pollakiuria, nocturnal enuresis, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, comprising a DNA comprising a DNA encoding metastin.

[10] A hypoglycemic agent, comprising an antibody to metastin or a salt thereof.

[11] An agent for suppressing pancreatic glucagon secretion, comprising an antibody to metastin or a salt thereof.

[12] An agent for suppressing urine formation, comprising an antibody to metastin or a salt thereof.

[0133] [13] An agent for preventing/treating diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, pollakiuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, comprising an antibody to metastin or a salt thereof.

[0134] [14] A diagnostic agent for obesity, hyperlipemia, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders, lipotoxicity, diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, pollakiuria, nocturnal enuresis, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, comprising an antibody to metastin or a salt thereof.

[15] A hypoglycemic agent, comprising an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding metastin.

[16] An agent for suppressing pancreatic glucagon secretion, comprising an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding metastin.

[17] An agent for suppressing urine formation, comprising an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding metastin.

[0135] [18] An agent for preventing/treating diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, pollakiuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, comprising an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding metastin.

[19] The agent according to [1] through [18], wherein metastin is:

(1) a peptide containing the N-terminal 47-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 and consisting of 8 to 54 amino acid residues,

(2) a peptide containing the N-terminal 134-141 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 and consisting of 8 to 54 amino acid residues,

(3) a peptide containing the N-terminal 138-145 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5 and consisting of 8 to 54 amino acid residues,

or,

(4) a peptide containing the N-terminal 112-119 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 and consisting of 8 to 54 amino acid residues.

[20] A hyperglycemic agent, comprising a metastin receptor or a salt thereof.

[21] A pancreatic glucagon secretagogue agent, comprising a metastin receptor or a salt thereof.

[22] An agent for promoting urine formation, comprising a metastin receptor or a salt thereof.

[0136] [23] An agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity, comprising a metastin receptor or a salt thereof.

[24] A hyperglycemic agent, comprising a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor.

[25] A pancreatic glucagon secretagogue agent, comprising a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor.

[26] An agent for promoting urine formation, comprising a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor.

[0137] [27] An agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity, comprising a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor.

[0138] [28] A diagnostic agent for obesity, hyperlipemia, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders, lipotoxicity, diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, pollakiuria, nocturnal enuresis, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, comprising a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor.

[29] A hypoglycemic agent, comprising an antibody to the metastin receptor or a salt thereof.

[30] An agent for suppressing pancreatic glucagon secretion, comprising an antibody to a metastin receptor or a salt thereof.

[31] An agent for suppressing urine formation, comprising an antibody to a metastin receptor or a salt thereof.

[0139] [32] An agent for preventing/treating diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, pollakiuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis,

thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, comprising an antibody to a metastin receptor or a salt thereof.

[0140] [33] An agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders, lipotoxicity, diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, pollakiuria, nocturnal enuresis, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, comprising an antibody to a metastin receptor or a salt thereof.

[34] A hypoglycemic agent, comprising an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor.

[35] An agent for suppressing pancreatic glucagon secretion, comprising an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor.

[36] An agent for suppressing urine formation, comprising an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor.

[0141] [37] An agent for preventing/treating diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, pollakiuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, comprising an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor.

[0142] [38] The agent according to [1] through [22], wherein the metastin receptor is a protein comprising the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 13.

[0143] [39] A method of screening a blood glucose regulating drug, a pancreatic glucagon regulating drug or a urine formation regulating drug, which comprises using metastin or a salt thereof and/or a metastin receptor, its partial peptide or a salt thereof.

[0144] [40] A kit for screening a blood glucose regulating drug, a pancreatic glucagon regulating drug or a urine formation regulating drug, comprising metastin or a salt thereof and/or a metastin receptor, its partial peptide or a salt thereof.

[0145] [41] A method of screening a blood glucose regulating drug, a pancreatic glucagon regulating drug or a urine formation regulating drug, which comprises using a DNA comprising a DNA encoding metastin and/or a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor or its partial peptide.

[0146] [42] A kit for screening a blood glucose regulating drug, a pancreatic glucagon regulating drug or a urine formation regulating drug, comprising a DNA comprising a DNA encoding metastin and/or a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor or its partial peptide.

[43] A hypoglycemic agent, comprising an antagonist to a metastin receptor.

[44] An agent for suppressing pancreatic glucagon secretion, comprising an antagonist to a metastin receptor.

[45] An agent for suppressing urine formation, comprising an antagonist to a metastin receptor.

[0147] [46] An agent for preventing/treating diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, polyuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, comprising an antagonist to a metastin receptor.

[47] A hyperglycemic agent, comprising a substance that promotes the expression of metastin.

[48] A pancreatic glucagon secretagogue agent, comprising a substance that promotes the expression of metastin.

[49] An agent for promoting urine formation, comprising a substance that promotes the expression of metastin.

[0148] [50] An agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity, comprising a substance that promotes the expression of metastin.

[51] A hypoglycemic agent, comprising a substance that suppresses the expression of metastin.

[52] An agent for suppressing pancreatic glucagon secretion, comprising a substance that suppresses the expression of metastin.

[53] An agent for suppressing urine formation, comprising a substance that suppresses the expression of metastin.

[0149] [54] An agent for preventing/treating diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, polyuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, comprising a substance that suppresses the expression of metastin.

[55] A hyperglycemic agent, comprising a substance that promotes the expression of a metastin receptor.

[56] A pancreatic glucagon secretagogue agent, comprising a substance that promotes the expression of a metastin receptor.

[57] An agent for promoting urine formation, comprising a substance that promotes the expression of a metastin receptor.

[0150] [58] An agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity, comprising a substance that promotes the expression of a metastin receptor.

[59] A hypoglycemic agent, comprising a substance that suppresses the expression of a metastin receptor.

[60] An agent for suppressing pancreatic glucagon secretion, comprising a substance that suppresses the expression of a metastin receptor.

[61] An agent for suppressing urine formation, comprising a substance that suppresses the expression of a metastin receptor.

[0151] [62] An agent for preventing/treating diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, polyuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, comprising a substance that suppresses the expression of a metastin receptor.

[63] A method of increasing blood glucose, which comprises administering to a mammal an effective dose of:

- (1) metastin or a salt thereof,
- (2) a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) a metastin receptor or a salt thereof,
- (4) a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) a substance that promotes the expression of metastin, or,
- (6) a substance that promotes the expression of a metastin receptor.

[64] A method of promoting pancreatic glucagon secretion, which comprises administering to a mammal an effective dose of:

- (1) metastin or a salt thereof,
- (2) a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) a metastin receptor or a salt thereof,
- (4) a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) a substance that promotes the expression of metastin, or,
- (6) a substance that promotes the expression of a metastin receptor.

[0152] [65] A method of preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity, which comprises administering to a mammal an effective dose of:

- (1) metastin or a salt thereof,
- (2) a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) a metastin receptor or a salt thereof,
- (4) a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) a substance that promotes the expression of metastin, or,
- (6) a substance that promotes the expression of a metastin receptor.

[66] A method of lowering blood glucose, which comprises administering to a mammal an effective dose of:

- (1) an antibody to metastin or a salt thereof,
- (2) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) an antibody to a metastin receptor or a salt thereof,
- (4) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) an antagonist to a metastin receptor,
- (6) a substance that suppresses the expression of metastin, or,
- (7) a substance that suppresses the expression of a metastin receptor.

[67] A method of suppressing pancreatic glucagon secretion, which comprises administering to a mammal an effective dose of:

- (1) an antibody to metastin or a salt thereof,
- (2) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) an antibody to a metastin receptor or a salt thereof,
- (4) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) an antagonist to a metastin receptor,
- (6) a substance that suppresses the expression of metastin, or,
- (7) a substance that suppresses the expression of a metastin receptor.

[0153] [68] A method of preventing/treating diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, polyuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning, which comprises administering to a mammal an effective dose of:

- (1) an antibody to metastin or a salt thereof,
- (2) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) an antibody to a metastin receptor or a salt thereof,
- (4) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) an antagonist to a metastin receptor,
- (6) a substance that suppresses the expression of metastin, or,
- (7) a substance that suppresses the expression of a metastin receptor.

[69] Use of:

- (1) metastin or a salt thereof,
- (2) a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) a metastin receptor or a salt thereof,

- (4) a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) a substance that promotes the expression of metastin, or,
- (6) a substance that promotes the expression of a metastin receptor, to manufacture a hyperglycemic agent.

[70] Use of:

- (1) metastin or a salt thereof,
- (2) a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) a metastin receptor or a salt thereof,
- (4) a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) a substance that promotes the expression of metastin, or,
- (6) a substance that promotes the expression of a metastin receptor, to manufacture a pancreatic glucagon secretagogue agent.

[71] Use of:

- (1) metastin or a salt thereof,
- (2) a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) a metastin receptor or a salt thereof,
- (4) a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) a substance that promotes the expression of metastin, or,
- [0154] (6) a substance that promotes the expression of a metastin receptor, to manufacture an agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity.

[72] Use of:

- (1) an antibody to metastin or a salt thereof,
- (2) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) an antibody to a metastin receptor or a salt thereof,
- (4) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) an antagonist to a metastin receptor,
- (6) a substance that suppresses the expression of metastin, or,
- (7) a substance that suppresses the expression of a metastin receptor, to manufacture a hypoglycemic agent.

[73] Use of:

- (1) an antibody to metastin or a salt thereof,
- (2) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) an antibody to a metastin receptor or a salt thereof,
- (4) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) an antagonist to a metastin receptor,
- (6) a substance that suppresses the expression of metastin, or,

(7) a substance that suppresses the expression of a metastin receptor, to manufacture an agent for suppressing pancreatic glucagon secretion.

[74] Use of:

- (1) an antibody to metastin or a salt thereof,
- (2) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding metastin,
- (3) an antibody to a metastin receptor or a salt thereof,
- (4) an antisense DNA to a DNA comprising a DNA encoding a metastin receptor,
- (5) an antagonist to a metastin receptor,
- (6) a substance that suppresses the expression of metastin, or,

[0155] (7) a substance that suppresses the expression of a metastin receptor, to manufacture an agent for preventing/treating diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, pollakiuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning.

[0156] [75] A method of screening a blood glucose regulating drug, a pancreatic glucagon regulating drug or a urine formation regulating drug, which comprises using (a) metastin and/or (b) a metastin receptor (hereinafter, including its partial peptide).

[0157] [76] A method of screening a blood glucose regulating drug, a pancreatic glucagon regulating drug or a urine formation regulating drug, which comprises using (a) a DNA comprising a DNA encoding metastin and/or (b) a DNA encoding a metastin receptor.

[0158] [77] A method of screening a substance that alters the binding property of metastin to a metastin receptor, which comprises assaying the binding amount of labeled metastin to a metastin receptor in the case wherein labeled metastin is brought in contact with the metastin receptor and in the case wherein labeled metastin and a test compound are brought in contact with the metastin receptor, and comparing the binding amount between these cases.

[0159] [78] A method of screening a substance that alters the binding property of metastin to a cell containing a metastin receptor or a membrane fraction of the cell, which comprises assaying the binding amount of labeled metastin to a cell containing a metastin receptor in the case wherein labeled metastin is brought in contact with the cell containing the metastin receptor or a membrane fraction of the cell and in the case wherein labeled metastin and a test compound are brought in contact with the cell or the membrane fraction, and comparing the binding amount between these cases.

[0160] [79] A method of screening a substance that alters the binding property of metastin to a metastin receptor, which comprises assaying the binding amount of labeled metastin to a metastin receptor, in the case wherein labeled metastin is brought in contact with a metastin receptor expressed on a cell membrane by culturing a transformant containing a DNA encoding the metastin receptor and in the case wherein labeled metastin and a test compound are

brought in contact with the metastin receptor expressed on a cell membrane by culturing a transformant containing a DNA encoding the metastin receptor, and comparing the binding amount between the cases.

[0161] [80] A method of screening a substance that alters the binding property of metastin to a metastin receptor, which comprises assaying a cell stimulating activity mediated by a metastin receptor, in the case wherein a metastin receptor-activating compound (e.g., metastin, the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof) is brought in contact with a cell (e.g., CHO cell, human colon cancer-derived cell line SW620) containing the metastin receptor and in the case wherein a metastin receptor-activating compound and a test compound are brought in contact with a cell containing the metastin receptor, and comparing the activity between the cases.

[0162] [81] A method of screening a substance that alters the binding property of metastin to a metastin receptor, which comprises assaying a cell stimulating activity mediated by a metastin receptor, in the case wherein a metastin receptor-activating compound (e.g., metastin, the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof) is brought in contact with a metastin receptor expressed on a cell membrane by culturing a transformant containing a DNA encoding the metastin receptor and in the case wherein a metastin receptor-activating compound and a test compound are brought in contact with the metastin receptor expressed on a cell membrane by culturing a transformant containing a DNA encoding the metastin receptor, and comparing the activity between the cases.

[0163] [82] A method of screening an agonist for a metastin receptor, which comprises assaying and comparing a cell stimulating activity mediated by the metastin receptor when a test compound is brought in contact with a cell containing the metastin receptor.

[0164] [83] A method of screening an agonist for a metastin receptor, which comprises assaying and comparing a cell stimulating activity mediated by the metastin receptor when a test compound is brought in contact with the metastin receptor expressed on a cell membrane by culturing a transformant containing a DNA encoding the metastin receptor.

[0165] [84] The screening method according to [80] through [83], wherein the cell stimulating activity is an intracellular Ca^{2+} release promoting activity, a cell growth inhibition activity, a chemotaxis inhibition activity, a tumor growth suppression activity, a hyperglycemic activity or a pancreatic glucagon secretagogue activity.

[0166] [85] A method of screening an agonist for a metastin receptor or an antagonist to a metastin receptor, which comprises using (a) the metastin derivative (I) according to [1] or a salt thereof, or a prodrug thereof and/or (b) a metastin receptor.

[0167] In the formula described above, each of Z^1 , Z^3 , Z^5 and Z^7 represents hydrogen atom or a C_{1-3} alkyl group; and each of Z^2 , Z^4 , Z^6 and Z^8 represents hydrogen atom, O or S.

[0168] The C_{1-3} alkyl group used includes methyl group, ethyl group, propyl group and isopropyl group.

[0169] Preferred combinations of Z^1 through Z^8 further include the cases wherein Z^1 and Z^3 represent hydrogen

atom, each of Z^5 and Z^7 represents hydrogen atom or a C_{1-3} alkyl group and each of Z^2 , Z^4 , Z^6 and Z^8 represents O or S.

[0170] More preferably, the combinations of Z^1 through Z^8 include:

[0171] (a) the case wherein Z^1 is hydrogen atom, Z^3 is hydrogen atom, Z^5 is hydrogen atom, Z^7 is hydrogen atom, Z^2 is O, Z^4 is O, Z^6 is O and Z^8 is O;

[0172] (b) the case wherein Z^1 is hydrogen atom, Z^3 is hydrogen atom, Z^5 is hydrogen atom, Z^7 is hydrogen atom, Z^2 is O, Z^4 is O, Z^6 is O and Z^8 is S;

[0173] (c) the case wherein Z^1 and Z^3 are hydrogen atom, Z^5 is hydrogen atom, Z^7 is methyl group, Z^2 is O, Z^4 is O, Z^6 is O and Z^8 is O; etc. Among others, the cases (a) and (b) are preferred.

[0174] R^1 represents (1) hydrogen atom, (2) a C_{1-8} alkyl group optionally substituted with a substituent selected from the group consisting of an optionally substituted carbamoyl group, an optionally substituted hydroxyl group and an optionally substituted aromatic cyclic group; among others, (1) hydrogen atom or (2) a C_{1-8} alkyl group, which is substituted with a substituent selected from the group consisting of an optionally substituted carbamoyl group, an optionally substituted hydroxyl group and an optionally substituted aromatic cyclic group, is preferred.

[0175] The " C_{1-8} alkyl group" used includes, for example, a linear C_{1-8} alkyl group such as methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, heptyl, octyl, etc., and a cyclic C_{3-8} alkyl group such as cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, etc. Among others, C_{1-3} alkyl groups such as methyl, ethyl, etc. are preferred.

[0176] The "optionally substituted carbamoyl group" used includes, for example, carbamoyl, a mono- C_{1-6} alkylcarbamoyl group (e.g., methylcarbamoyl, ethylcarbamoyl, etc.), a di- C_{1-6} alkylcarbamoyl group (e.g., dimethylcarbamoyl, diethylcarbamoyl, ethylmethylcarbamoyl, etc.), a mono- or di- C_{6-14} arylcarbamoyl group (e.g., phenylcarbamoyl, 1-naphthylcarbamoyl, 2-naphthylcarbamoyl, etc.), a mono- or di-5- to 7-membered heterocyclic carbamoyl group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms (e.g., 2-pyridylcarbamoyl, 3-pyridylcarbamoyl, 4-pyridylcarbamoyl, 2-thienylcarbamoyl, 3-thienylcarbamoyl, etc.) and the like.

[0177] The "optionally substituted hydroxyl group" used includes, for example, hydroxy group, an optionally substituted C_{1-6} alkoxy group, an optionally substituted C_{6-14} aryloxy group, an optionally substituted C_{7-16} aralkyloxy group, etc. The "optionally substituted C_{1-6} alkoxy group," "optionally substituted C_{6-14} aryloxy group" and "optionally substituted C_{7-16} aralkyloxy group" used are the same as given for the "optionally substituted C_{1-6} alkoxy group," "optionally substituted C_{6-14} aryloxy group" and "optionally substituted C_{7-16} aralkyloxy group" in Substituent group A, which will be later described.

[0178] The "aromatic cyclic group" in "optionally substituted aromatic cyclic group" includes, for example, an aromatic hydrocarbon group, an aromatic heterocyclic group, an aromatic fused-ring group, an aromatic fused heterocyclic group, etc.

[0179] The "aromatic hydrocarbon group" used includes, for example, a C_{6-14} aryl group such as phenyl, 2-biphenyl, 3-biphenyl, 4-biphenyl, cyclooctatetraenyl, etc.

[0180] The "aromatic heterocyclic group" used includes, for example, a 5- to 14-membered, preferably 5- to 10-membered, more preferably 5- or 6-membered aromatic heterocyclic group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms. Specific examples are thienyl (e.g., 2-thienyl, 3-thienyl), furyl (e.g., 2-furyl, 3-furyl), pyridyl (e.g., 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl), thiazolyl (e.g., 2-thiazolyl, 4-thiazolyl, 5-thiazolyl), oxazolyl (e.g., 2-oxazolyl, 4-oxazolyl), pyrazinyl, pyrimidinyl (e.g., 2-pyrimidinyl, 4-pyrimidinyl), pyrrolyl (e.g., 1-pyrrolyl, 2-pyrrolyl, 3-pyrrolyl), imidazolyl (e.g., 1-imidazolyl, 2-imidazolyl, 4-imidazolyl), pyrazolyl (e.g., 1-pyrazolyl, 3-pyrazolyl, 4-pyrazolyl), pyridazinyl (e.g., 3-pyridazinyl, 4-pyridazinyl), isothiazolyl (e.g., 3-isothiazolyl), isooxazolyl (e.g., 3-isooxazolyl), etc.

[0181] The "aromatic fused-ring group" used includes a C_{14} aromatic fused-ring group such as naphthyl (e.g., 1-naphthyl, 2-naphthyl), anthryl (e.g., 2-anthryl, 9-anthryl) and the like.

[0182] The "aromatic fused heterocyclic group" used includes, for example, a 5- to 14-membered (preferably 5- to 10-membered) bicyclic or tricyclic aromatic heterocyclic group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to 3 to 11 carbon atoms, or a monovalent group formed by removing one optional hydrogen atom from a 7- to 10-membered aromatic bridged-hetero ring in a 5- to 14-membered (preferably 5- to 10-membered) ring containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms. Specific examples of these groups used are quinolyl (e.g., 2-quinolyl, 3-quinolyl, 4-quinolyl, 5-quinolyl, 8-quinolyl), isoquinolyl (e.g., 1-isoquinolyl, 3-isoquinolyl, 4-isoquinolyl, 5-isoquinolyl), indolyl (e.g., 1-indolyl, 2-indolyl, 3-indolyl), 2-benzothiazolyl, benzo[b]thienyl (e.g., 2-benzo[b]thienyl, 3-benzo[b]thienyl), benzo[b]furanlyl (e.g., 2-benzo[b]furanlyl, 3-benzo[b]furanlyl) and the like.

[0183] The "substituent" used for the "aromatic cyclic group" includes a substituent selected from the Substituent group A, which will be later described.

[0184] For R^1 , there are used, for example, hydrogen atom, carbamoylmethyl, 2-carbamoylethyl, hydroxymethyl, 1-hydroxyethyl, benzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-pyridylmethyl, 3-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, 2-thienylmethyl, 3-thienylmethyl, 1-naphthylmethyl, 2-naphthylmethyl, 3-indolylmethyl, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, cyclohexylmethyl, etc.; among others, hydroxymethyl, 1-hydroxyethyl, benzyl, 4-hydroxybenzyl, 3-indolylmethyl, methyl, isobutyl, etc. are preferably used, with particular preference of hydroxymethyl, 1-hydroxyethyl, etc.

[0185] R^2 represents (1) hydrogen atom, (2) a cyclic or linear C_{1-10} alkyl group or (3) a C_{1-10} alkyl group consisting of a cyclic alkyl group and a linear alkyl group.

[0186] The cyclic C_{1-10} alkyl group used includes, for example, a C_{3-8} cycloalkyl group such as cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, etc.

[0187] The linear C_{1-10} alkyl group includes, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonanyl, decanyl, etc.

[0188] The C_{1-10} alkyl group consisting of a cyclic alkyl group and a linear alkyl group used includes, for example, a C_{3-7} cycloalkyl- C_{1-3} alkyl group such as cyclopentylmethyl, cyclohexylmethyl, etc.

[0189] Preferably, R^2 is methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, cyclohexylmethyl, etc.; among others, methyl, ethyl, isopropyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, etc. are preferred, with particular preference of isopropyl, isobutyl, etc.

[0190] R^3 represents:

(1) a C_{1-8} alkyl group having an optionally substituted basic group and further optionally having an additional substituent,

(2) an aralkyl group having an optionally substituted basic group and optionally having an additional substituent,

(3) a C_{1-4} alkyl group having a non-aromatic cyclic hydrocarbon group of carbon atoms not greater than 7 having an optionally substituted basic group, and further optionally having an additional substituent, or,

(4) a C_{1-4} alkyl group having a non-aromatic heterocyclic group of carbon atoms not greater than 7 having an optionally substituted basic group, and further optionally having an additional substituent.

[0191] The "optionally substituted basic group" used includes, for example, (1) a guanidino group optionally having 1 or 2 substituents from a C_{1-6} alkyl, a C_{1-6} acyl (e.g., methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, acetyl, propionyl, etc.), etc., (2) an amino group optionally having 1 to 3 substituents from a C_{1-6} alkyl, a C_{1-6} acyl (e.g., methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, acetyl, propionyl, etc.), etc., (3) a C_{1-6} alkylcarbonyl-amino group (e.g., acetamido) optionally substituted with a guanidino group optionally having 1 to 3 substituents from a C_{1-6} alkyl, a C_{1-6} acyl (e.g., methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, acetyl, propionyl, etc.), etc., (4) a C_{1-6} alkylcarbonyl-amino group (e.g., acetamido) optionally substituted with an amino group optionally having 1 to 3 substituents from a C_{1-6} alkyl, a C_{1-6} acyl (e.g., methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, acetyl, propionyl, etc.), etc. Among others, preferred are guanidino, N-methylguanidino, N,N-dimethylguanidino, N,N'-dimethylguanidino, N-ethylguanidino, N-acetylguanidino, amino, N-methylamino, N,N-dimethylamino, aminoacetamido, guanidinoacetamido, amidino, etc.

[0192] The "additional substituent" other than the "optionally substituted basic group" used includes a substituent selected from the Substituent group A later described.

[0193] The " C_{1-8} alkyl group" used includes, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, heptyl, octyl, etc.

[0194] The "aralkyl group" used includes, for example, a C_{7-16} aralkyl group such as benzyl, phenethyl, diphenylmethyl, 1-naphthylmethyl, 2-naphthylmethyl, 2,2-diphenyl-

ethyl, 3-phenylpropyl, 4-phenylbutyl, 5-phenylpentyl, 2-biphenylmethyl, 3-biphenylmethyl, 4-biphenylmethyl, etc.

[0195] The "non-aromatic cyclic hydrocarbon group of carbon atoms not greater than 7" used includes, for example, a C_{3-7} cycloalkyl group such as cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, etc.

[0196] The "non-aromatic heterocyclic group of carbon atoms not greater than 7" used includes, for example, a 5- to 10-membered non-aromatic heterocyclic group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to 1 to 7 carbon atoms, etc. Specifically used are pyrrolidinyl (e.g., 1-pyrrolidinyl, 2-pyrrolidinyl, 3-pyrrolidinyl), an oxazolidinyl (e.g., 2-oxazolidinyl), imidazolyl (e.g., 1-imidazolyl, 2-imidazolyl, 4-imidazolyl), piperidinyl (e.g., 1-piperidinyl, 2-piperidinyl, 3-piperidinyl, 4-piperidinyl), piperazinyl (e.g., 1-piperazinyl, 2-piperazinyl), morpholino, thiomorpholino, etc.

[0197] The " C_{1-4} alkyl group" used includes, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, etc.

[0198] For R^3 , there are used, for example, (1) 3-guanidinopropyl, 3-(N-methylguanidino)propyl, 3-(N,N-dimethylguanidino)propyl, 3-(N,N'-dimethylguanidino)propyl, 3-(N-ethylguanidino)propyl, 3-(N-propylguanidino)propyl, 3-(N-acetylguanidino)propyl, 4-guanidinobutyl, 4-(N-methylguanidino)butyl, 2-guanidinoethyl, 2-(N-methylguanidino)ethyl, 4-aminobutyl, 4-(N-methylamino)butyl, 4-(N,N-dimethylamino)butyl, 2-aminopropyl, 2-aminoethyl, aminomethyl, aminoacetamidomethyl, guanidinoacetamidomethyl, 2-(guanidinocarbonyl)ethyl, (2) 4-guanidinobenzyl, 4-aminobenzyl, (3) 4-guanidinocyclohexylmethyl, 4-aminocyclohexylmethyl, (4) 1-amidinopiperidin-4-ylmethyl, etc.; among others, preferred are 3-guanidinopropyl, 3-(N-methylguanidino)propyl, 3-(N,N-dimethylguanidino)propyl, 3-(N,N'-dimethylguanidino)propyl, 3-(N-ethylguanidino)propyl, 3-(N-propylguanidino)propyl, 3-(N-acetylguanidino)propyl, 4-guanidinobutyl, 4-(N-methylguanidino)butyl, 2-guanidinoethyl, 2-(N-methylguanidino)ethyl, 4-aminobutyl, 4-(N-methylamino)butyl, 4-(N,N-dimethylamino)butyl, 3-aminopropyl, 2-aminoethyl, 4-aminobenzyl, aminoacetamidomethyl, guanidinoacetamidomethyl, etc., and particularly preferred are 3-guanidinopropyl, 3-(N-methylguanidino)propyl, 3-(N,N-dimethylguanidino)propyl, 3-(N,N'-dimethylguanidino)propyl, 3-(N-ethylguanidino)propyl, 3-(N-propylguanidino)propyl, 3-(N-acetylguanidino)propyl, 4-guanidinobutyl, 4-(N-methylguanidino)butyl, 2-guanidinoethyl, 4-aminobutyl, etc.

[0199] R^4 represents a C_{1-4} alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent selected from the group consisting of:

(1) an optionally substituted C_{6-12} aromatic hydrocarbon group;

(2) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms;

(3) an optionally substituted C_{8-14} aromatic fused-ring group;

(4) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms;

(5) an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7, and

(6) an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7; among others, preferred are a C_{1-4} alkyl group substituted with a substituent selected from the group consisting of:

(1) an optionally substituted C_{6-12} aromatic hydrocarbon group;

(2) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms;

(3) an optionally substituted C_{8-14} aromatic fused-ring group;

(4) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms;

(5) an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7; and,

(6) an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7.

[0200] The " C_{1-4} alkyl group" used includes, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, etc.

[0201] The " C_{6-12} aromatic hydrocarbon group" used includes, for example, a monocyclic C_{6-12} aromatic hydrocarbon group such as phenyl, cyclooctatetraenyl, etc.

[0202] The "5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms" used includes, for example, a 5- to 14-membered, preferably 5- to 10-membered, more preferably 5- or 6-membered monocyclic aromatic heterocyclic group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to 1 to 7 carbon atoms. Specific examples used are thienyl (e.g., 2-thienyl, 3-thienyl), furyl (e.g., 2-furyl, 3-furyl), pyridyl (e.g., 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl), thiazolyl (e.g., 2-thiazolyl, 4-thiazolyl, 5-thiazolyl), oxazolyl (e.g., 2-oxazolyl, 4-oxazolyl), pyrazinyl, pyrimidinyl (e.g., 2-pyrimidinyl, 4-pyrimidinyl), pyrrolyl (e.g., 1-pyrrolyl, 2-pyrrolyl, 3-pyrrolyl), imidazolyl (e.g., 1-imidazolyl, 2-imidazolyl, 4-imidazolyl), pyrazolyl (e.g., 1-pyrazolyl, 3-pyrazolyl, 4-pyrazolyl), pyridazinyl (e.g., 3-pyridazinyl, 4-pyridazinyl), isothiazolyl (e.g., 3-isothiazolyl), isoxazolyl (e.g., 3-isoxazolyl), etc.

[0203] The " C_{8-14} aromatic fused-ring group" used includes, for example, naphthyl (e.g., 1-naphthyl, 2-naphthyl), anthryl (e.g., 2-anthryl, 9-anthryl), etc.

[0204] The "optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms" includes,

for example, a 5- to 14-membered (preferably 5- to 10-membered) bicyclic or tricyclic aromatic heterocyclic group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to 3 to 11 carbon atoms, or a monovalent group formed by removing one optional hydrogen atom from a 7- to 10-membered aromatic bridged-hetero ring in a 5- to 14-membered (preferably 5- to 10-membered) ring containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms. Specific examples used are quinolyl (e.g., 2-quinolyl, 3-quinolyl, 4-quinolyl, 5-quinolyl, 8-quinolyl), isoquinolyl (e.g., 1-isoquinolyl, 3-isoquinolyl, 4-isoquinolyl, 5-isoquinolyl), indolyl (e.g., 1-indolyl, 2-indolyl, 3-indolyl), 2-benzothiazolyl, benzo[b]thienyl (e.g., 2-benzo[b]thienyl, 3-benzo[b]thienyl), benzo[b]furanlyl (e.g., 2-benzo[b]furanlyl, 3-benzo[b]furanlyl), etc.

[0205] The "non-aromatic cyclic hydrocarbon group of carbon atoms not greater than 7" used includes, for example, a C_{3-7} cycloalkyl group such as cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, etc.

[0206] The "non-aromatic heterocyclic group of carbon atoms not greater than 7" used includes, for example, a 5- to 10-membered non-aromatic heterocyclic group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms, in addition to 1 to 7 carbon atoms, such as pyrrolidinyl (e.g., 1-pyrrolidinyl, 2-pyrrolidinyl, 3-pyrrolidinyl), an oxazolidinyl (e.g., 2-oxazolidinyl), imidazolinyl (e.g., 1-imidazolinyl, 2-imidazolinyl, 4-imidazolinyl), piperidinyl (e.g., 1-piperidinyl, 2-piperidinyl, 3-piperidinyl, 4-piperidinyl), piperazinyl (e.g., 1-piperazinyl, 2-piperazinyl), morpholino, thiomorpholino, etc.

[0207] The substituents used in these " C_{6-12} aromatic hydrocarbon group," "5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms," " C_{8-14} aromatic fused-ring group," "5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms," "non-aromatic cyclic hydrocarbon group of carbon atoms not greater than 7" and "non-aromatic heterocyclic group of carbon atoms not greater than 7" include, for example, substituents selected from oxo, a halogen atom (e.g., fluorine, chlorine, bromine, iodine, etc.), a C_{1-3} alkylenedioxy (e.g., methylenedioxy, ethylenedioxy, etc.), nitro, cyano, an optionally substituted C_{1-6} alkyl, an optionally substituted C_{2-6} alkenyl, an optionally substituted C_{2-6} alkynyl, an optionally substituted C_{3-8} cycloalkyl, an optionally substituted C_{6-14} aryl, an optionally substituted C_{7-16} aralkyl, an optionally substituted C_{1-6} alkoxy, hydroxy, an optionally substituted C_{6-14} aryloxy, an optionally substituted C_{7-16} aralkyloxy, mercapto, an optionally substituted C_{1-6} alkylthio, an optionally substituted C_{6-14} arylthio, an optionally substituted C_{7-16} aralkylthio, an optionally substituted amino [amino, an optionally substituted mono- or di- C_{1-6} alkyl-amino (e.g., methylamino, dimethylamino, ethylamino, diethylamino, propylamino, isopropylamino, etc.), an optionally substituted mono- or di- C_{2-6} alkenyl-amino (e.g., vinylamino, propenylamino, isopropenylamino), an optionally substituted C_{2-6} alkynyl-amino (e.g., 2-butyne-1-yl-amino, 4-pentyne-1-yl-amino, 5-hexyne-1-yl-amino), an optionally substituted mono- or di- C_{3-8} cycloalkyl-amino

(e.g., cyclopropylamino, cyclohexylamino), an optionally substituted C_{6-14} aryl-amino (e.g., phenylamino, diphenylamino, naphthylamino), an optionally substituted C_{1-6} alkoxy-amino (e.g., methoxyamino, ethoxyamino, propoxyamino, isopropoxyamino), formylamino, an optionally substituted C_{1-6} alkylcarbonyl-amino (e.g., acetyl-amino, propionylamino, pivaloylamino, etc.), an optionally substituted C_{3-8} cycloalkyl-carbonylamino (e.g., cyclopropylcarbonylamino, cyclopentylcarbonylamino, cyclohexylcarbonylamino, etc.), an optionally substituted C_{6-14} arylcarbonylamino (e.g., benzoylamino, naphthoylamino, etc.), an optionally substituted C_{1-6} alkoxy-carbonylamino (e.g., methoxycarbonylamino, ethoxycarbonylamino, propoxycarbonylamino, butoxycarbonylamino, etc.), an optionally substituted C_{1-6} alkylsulfonylamino (e.g., methylsulfonylamino, ethylsulfonylamino, etc.), an optionally substituted C_{6-14} arylsulfonylamino (e.g., phenylsulfonylamino, 2-naphthylsulfonylamino, 1-naphthylsulfonylamino, etc.), formyl, carboxy, an optionally substituted C_{1-6} alkylcarbonyl (e.g., acetyl, propionyl, pivaloyl, etc.), an optionally substituted C_{3-8} cycloalkylcarbonyl (e.g., cyclopropylcarbonyl, cyclopentylcarbonyl, cyclohexylcarbonyl, 1-methylcyclohexylcarbonyl, etc.), an optionally substituted C_{6-14} arylcarbonyl (e.g., benzoyl, 1-naphthoyl, 2-naphthoyl, etc.), an optionally substituted C_{7-16} aralkylcarbonyl (e.g., phenylacetyl, 3-phenylpropionyl, etc.), an optionally substituted 5- to 7-membered heterocyclic carbonyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms (e.g., nicotinoyl, isonicotinoyl, thenoyl, furyl, morpholinocarbonyl, thiomorpholinocarbonyl, piperazin-1-ylcarbonyl, pyrrolidin-1-ylcarbonyl, etc.), an optionally esterified carboxyl, an optionally substituted carbamoyl group, an optionally substituted C_{1-6} alkylsulfonyl (e.g., methylsulfonyl, ethylsulfonyl, etc.), an optionally substituted C_{1-6} alkylsulfinyl (e.g., methylsulfinyl, ethylsulfinyl, etc.), an optionally substituted C_{6-14} arylsulfonyl (e.g., phenylsulfonyl, 1-naphthylsulfonyl, 2-naphthylsulfonyl, etc.), an optionally substituted C_{6-14} arylsulfinyl (e.g., phenylsulfinyl, 1-naphthylsulfinyl, 2-naphthylsulfinyl, etc.), an optionally substituted C_{1-6} alkylcarbonyloxy (e.g., acetoxy, propionyloxy, etc.), an optionally substituted C_{6-14} arylcarbonyloxy (e.g., benzoyloxy, naphthylcarbonyloxy, etc.), an optionally substituted C_{1-6} alkoxy-carbonyloxy (e.g., methoxycarbonyloxy, ethoxycarbonyloxy, propoxycarbonyloxy, butoxycarbonyloxy, etc.), an optionally substituted a mono- C_{1-6} alkylcarbamoxyloxy (e.g., methylcarbamoxyloxy, ethylcarbamoxyloxy, etc.), an optionally substituted di- C_{1-6} alkylcarbamoxyloxy (e.g., dimethylcarbamoxyloxy, diethylcarbamoxyloxy, etc.), an optionally substituted a mono- or di- C_{6-14} arylcarbamoxyloxy (e.g., phenylcarbamoxyloxy, naphthylcarbamoxyloxy, etc.), an optionally substituted heterocyclic group, sulfo, sulfamoyl, sulfenamoyl, or a group of 2 or more (e.g., 2 or 3) of these substituents combined, and the like (Substituent group A). The number of the substituents is not particularly limited but these rings may have 1 to 5, preferably 1 to 3 substituents in substitutable positions; when there are two or more substituents, these substituents may be the same or different.

[0208] The "optionally esterified carboxyl group" in the Substituent group A includes, for example, an optionally substituted C_{1-6} alkoxy-carbonyl (e.g., methoxycarbonyl, ethoxycarbonyl, propoxycarbonyl, tert-butoxycarbonyl, etc.), an optionally substituted C_{6-14} aryloxy-carbonyl (e.g.,

phenoxycarbonyl, etc.), an optionally substituted C_{7-16} aralkyloxy-carbonyl (e.g., benzyloxy-carbonyl, phenethyloxy-carbonyl, etc.), and the like.

[0209] The " C_{1-6} alkyl" in the "optionally substituted C_{1-6} alkyl" in the Substituent group A includes, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, etc.

[0210] The " C_{2-6} alkenyl" of the "optionally substituted C_{2-6} alkenyl" in the Substituent group A includes, for example, vinyl, propenyl, isopropenyl, 2-buten-1-yl, 4-penten-1-yl, 5-hexen-1-yl, etc.

[0211] The " C_{2-6} alkynyl" in the "optionally substituted C_{2-6} alkynyl" in the Substituent group A includes, for example, 2-butyne-1-yl, 4-pentyne-1-yl, 5-hexyne-1-yl, etc.

[0212] The " C_{3-8} cycloalkyl" in the "optionally substituted C_{3-8} cycloalkyl" in the Substituent group A includes, for example, cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, etc.

[0213] The C_{6-14} aryl in the optionally substituted C_{6-14} aryl in the Substituent group A includes, for example, phenyl, 1-naphthyl, 2-naphthyl, 2-biphenyl, 3-biphenyl, 4-biphenyl, 2-anthryl, etc.

[0214] The " C_{7-16} aralkyl" in the "optionally substituted C_{7-16} aralkyl" in the Substituent group A includes, for example, benzyl, phenethyl, diphenylmethyl, 1-naphthylmethyl, 2-naphthylmethyl, 2,2-diphenylethyl, 3-phenylpropyl, 4-phenylbutyl, 5-phenylpentyl, 2-biphenylmethyl, 3-biphenylmethyl, 4-biphenylmethyl, etc.

[0215] The " C_{1-6} alkoxy" in the "optionally substituted C_{1-6} alkoxy" in the Substituent group A includes, for example, methoxy, ethoxy, propoxy, isopropoxy, butoxy, isobutoxy, sec-butoxy, pentyloxy, hexyloxy, etc.

[0216] The " C_{6-14} aryloxy" in the "optionally substituted C_{6-14} aryloxy" in the Substituent group A includes, for example, phenyloxy, 1-naphthyloxy, 2-naphthyloxy, etc.

[0217] The " C_{7-16} aralkyloxy" in the "optionally substituted C_{7-16} aralkyloxy" in the Substituent group A includes, for example, benzyloxy, phenethyloxy, etc.

[0218] The " C_{1-6} alkylthio" in the "optionally substituted C_{1-6} alkylthio" in the Substituent group A includes, for example, methylthio, ethylthio, propylthio, isopropylthio, butylthio, sec-butylthio, tert-butylthio, etc.

[0219] The " C_{6-14} arylthio" in the "optionally substituted C_{6-14} arylthio" in the Substituent group A includes, for example, phenylthio, 1-naphthylthio, 2-naphthylthio, etc.

[0220] The " C_{7-16} aralkylthio" in the "optionally substituted C_{7-16} aralkylthio" in the Substituent group A includes, for example, benzylthio, phenethylthio, etc.

[0221] The substituents in the Substituent group A for these " C_{1-6} alkoxy-carbonyl," " C_{1-6} alkyl group," " C_{2-6} alkenyl," " C_{2-6} alkynyl," " C_{1-6} alkoxy," " C_{1-6} alkylthio," " C_{1-6} alkylamino," " C_{2-6} alkenylamino," " C_{2-6} alkynylamino," " C_{1-6} alkoxyamino," " C_{1-6} alkylcarbonyl," " C_{1-6} alkylsulfonyl," " C_{1-6} alkylsulfinyl," " C_{1-6} alkylcarbonylamino," " C_{1-6} alkoxy-carbonylamino," " C_{1-6} alkylsulfonylamino," " C_{1-6} alkylcarbonyloxy," " C_{1-6} alkoxy-carbonyloxy," "mono- C_{1-6} alkylcarbamoxyloxy" and "di- C_{1-6} alkylcarbamoxyloxy" include, for example, 1 to 5 substituents selected from a

halogen atom (e.g., fluorine atom, chlorine atom, bromine atom, iodine atom), carboxy, hydroxy, amino, a mono- or di- C_{1-6} alkylamino, a mono- or di- C_{6-14} arylamino, a C_{3-8} cycloalkyl, a C_{1-6} alkoxy, a C_{1-6} alkoxycarbonyl, a C_{1-6} alkylthio, a C_{1-6} alkylsulfinyl, a C_{1-6} alkylsulfonyl, the optionally esterified carboxyl described above, carbamoyl, thiocarbamoyl, a mono- C_{1-6} alkylcarbamoyl (e.g., methylcarbamoyl, ethylcarbamoyl, etc.), a di- C_{1-6} alkylcarbamoyl (e.g., dimethylcarbamoyl, diethylcarbamoyl, ethylmethylcarbamoyl, etc.), a mono- or di- C_{6-14} arylcarbamoyl (e.g., phenylcarbamoyl, 1-naphthylcarbamoyl, 2-naphthylcarbamoyl, etc.), a mono- or di-5- to 7-membered heterocyclic carbamoyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms (e.g., 2-pyridylcarbamoyl, 3-pyridylcarbamoyl, 4-pyridylcarbamoyl, 2-thienylcarbamoyl, 3-thienylcarbamoyl, etc.) and the like.

[0222] The substituents in the Substituent group A for the " C_{6-14} aryloxycarbonyl," " C_{7-16} aralkyloxycarbonyl," " C_{3-8} cycloalkyl," " C_{6-14} aryl," " C_{7-16} aralkyl," " C_{6-14} aryloxy," " C_{7-16} aralkyloxy," " C_{6-14} arylthio," " C_{7-16} aralkylthio," " C_{3-8} cycloalkylamino," " C_{6-14} arylamino," " C_{3-8} cycloalkylcarbonyl," " C_{6-14} arylcarbonyl," " C_{7-16} aralkylcarbonyl," "5- to 7-membered heterocyclic carbonyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms," " C_{6-14} arylsulfonyl," " C_{6-14} arylsulfinyl," " C_{3-8} cycloalkylcarbonylamino," " C_{6-14} arylcarbonylamino," " C_{6-14} arylsulfonylamino," " C_{6-14} arylcarbonyloxy" and "mono- or di- C_{6-14} arylcarbamoyloxy" include, for example, 1 to 5 substituents selected from a halogen atom, hydroxy, carboxy, nitro, cyano, the optionally substituted C_{1-6} alkyl described above, the optionally substituted C_{2-6} alkenyl described above, the optionally substituted C_{2-6} alkynyl described above, the optionally substituted C_{3-8} cycloalkyl described above, the optionally substituted C_{1-6} alkoxy described above, the optionally substituted C_{1-6} alkylthio described above, the optionally substituted C_{1-6} alkylsulfinyl described above, the optionally substituted C_{1-6} alkylsulfonyl described above, the optionally esterified carboxyl described above, carbamoyl, thiocarbamoyl, a mono- C_{1-6} alkylcarbamoyl, a di- C_{1-6} alkylcarbamoyl, a mono- or di- C_{6-14} arylcarbamoyl, a mono- or di-5- to 7-membered heterocyclic carbamoyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms, and the like.

[0223] The "optionally substituted heterocyclic group" in the Substituent group A includes, for example, a 5- to 14-membered (monocyclic, bicyclic or tricyclic) heterocyclic group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms, which may optionally be substituted with a halogen atom, hydroxy, carboxy, nitro, cyano, the optionally substituted C_{1-6} alkyl described above, the optionally substituted C_{2-6} alkenyl described above, the optionally substituted C_{2-6} alkynyl described above, the optionally substituted C_{3-8} cycloalkyl described above, the optionally substituted C_{6-14} aryl described above, the optionally substituted C_{1-6} alkoxy described above, the optionally substituted C_{1-6} alkylthio described above, the optionally substituted C_{6-14} arylthio described above, the optionally substituted C_{7-16} aralkylthio described above, the optionally substituted C_{1-6} alkylsulfinyl described above, the optionally substituted C_{6-14} arylsulfinyl described above, the optionally

substituted C_{1-6} alkylsulfonyl described above, the optionally substituted C_{6-14} arylsulfonyl described above, the optionally esterified carboxyl described above, carbamoyl, thiocarbamoyl, a mono- C_{1-6} alkylcarbamoyl, a di-lower alkylcarbamoyl, a mono- or di- C_{6-14} arylcarbamoyl, a mono- or di-5- to 7-membered heterocyclic carbamoyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms, or the like; preferably (i) a 5- to 14-membered (preferably, 5- to 10-membered) aromatic heterocyclic group, (ii) a 5- to 10-membered non-aromatic heterocyclic group or (iii) a monovalent group formed by removing one optional hydrogen atom from a 7- to 10-membered bridged-hetero ring, and more preferably, a 5-membered aromatic heterocyclic group. Specifically used are an aromatic heterocyclic group such as thienyl (e.g., 2-thienyl, 3-thienyl), furyl (e.g., 2-furyl, 3-furyl), pyridyl (e.g., 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl), thiazolyl (e.g., 2-thiazolyl, 4-thiazolyl, 5-thiazolyl), oxazolyl (e.g., 2-oxazolyl, 4-oxazolyl), quinolyl (e.g., 2-quinolyl, 3-quinolyl, 4-quinolyl, 5-quinolyl, 8-quinolyl), isoquinolyl (e.g., 1-isoquinolyl, 3-isoquinolyl, 4-isoquinolyl, 5-isoquinolyl), pyrazinyl, pyrimidinyl (e.g., 2-pyrimidinyl, 4-pyrimidinyl), pyrrolyl (e.g., 1-pyrrolyl, 2-pyrrolyl, 3-pyrrolyl), imidazolyl (e.g., 1-imidazolyl, 2-imidazolyl, 4-imidazolyl), pyrazolyl (e.g., 1-pyrazolyl, 3-pyrazolyl, 4-pyrazolyl), pyridazinyl (e.g., 3-pyridazinyl, 4-pyridazinyl), isothiazolyl (e.g., 3-isothiazolyl), isoxazolyl (e.g., 3-isoxazolyl), indolyl (e.g., 1-indolyl, 2-indolyl, 3-indolyl), 2-benzothiazolyl, benzo[b]thienyl (e.g., 2-benzo[b]thienyl, 3-benzo[b]thienyl), benzo[b]furanlyl (e.g., 2-benzo[b]furanlyl, 3-benzo[b]furanlyl), etc., a non-aromatic heterocyclic group such as pyrrolidinyl (e.g., 1-pyrrolidinyl, 2-pyrrolidinyl, 3-pyrrolidinyl), oxazolidinyl (e.g., 2-oxazolidinyl), imidazolinyl (e.g., 1-imidazolinyl, 2-imidazolinyl, 4-imidazolinyl), piperidinyl (e.g., 1-piperidinyl, 2-piperidinyl, 3-piperidinyl, 4-piperidinyl), piperazinyl (e.g., 1-piperazinyl, 2-piperazinyl), morpholino, thiomorpholino, etc.

[0224] The "optionally substituted carbamoyl group" in the Substituent group A includes a carbamoyl group, which may optionally be substituted with the optionally substituted C_{1-6} alkyl described above, an optionally substituted C_{2-6} alkenyl, an optionally substituted C_{2-6} alkynyl, an optionally substituted C_{3-8} cycloalkyl, an optionally substituted C_{6-14} aryl, an optionally substituted heterocyclic group, etc. Specific examples are carbamoyl, thiocarbamoyl, a mono- C_{1-6} alkylcarbamoyl (e.g., methylcarbamoyl, ethylcarbamoyl, etc.), a di- C_{1-6} alkylcarbamoyl (e.g., dimethylcarbamoyl, diethylcarbamoyl, ethylmethylcarbamoyl, etc.), a C_{1-6} alkyl (C_{1-6} alkoxy)carbamoyl (e.g., methyl(methoxy)carbamoyl, ethyl(methoxy)carbamoyl), a mono- or di- C_{6-14} arylcarbamoyl (e.g., phenylcarbamoyl, 1-naphthylcarbamoyl, 2-naphthylcarbamoyl, etc.), a mono- or di-5- to 7-membered heterocyclic carbamoyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms (e.g., 2-pyridylcarbamoyl, 3-pyridylcarbamoyl, 4-pyridylcarbamoyl, 2-thienylcarbamoyl, 3-thienylcarbamoyl, etc.), a 5- to 7-membered cyclic carbamoyl (e.g., 1-pyrrolidinylcarbonyl, 1-piperidinylcarbonyl, hexamethyleneiminocarbonyl), and the like.

[0225] The "optionally substituted amino" in the Substituent group A includes an amino, which may optionally be substituted with 1 or 2 groups selected from the optionally substituted C_{1-6} alkyl, the optionally substituted C_{2-6} alkenyl described above, the optionally substituted C_{2-6} alkynyl

described above, the optionally substituted C_{3-8} cycloalkyl described above, the optionally substituted C_{6-14} aryl described above, the optionally substituted C_{1-6} alkoxy described above, formyl, the optionally substituted C_{1-6} alkylcarbonyl described above, the optionally substituted C_{3-8} cycloalkylcarbonyl described above, the optionally substituted C_{6-14} arylcarbonyl described above, the optionally substituted C_{1-6} alkoxy carbonyl described above, the optionally substituted C_{1-6} alkylsulfonyl described above, an optionally substituted C_{6-14} arylsulfonyl and the like.

[0226] More preferably, the substituents for the " C_{6-12} aromatic hydrocarbon group," " $5-$ to 14 -membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms," " C_{8-14} aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms," "non-aromatic cyclic hydrocarbon group of carbon atoms not greater than 7 " and "non-aromatic heterocyclic group of carbon atoms not greater than 7 " include a halogen atom, hydroxy, a C_{1-6} alkoxy, an optionally halogenated C_{1-6} alkyl, an optionally halogenated C_{1-6} alkoxy, amino, nitro, cyano, etc.

[0227] Examples of R^4 used include:

[0228] (1) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted C_{6-12} aromatic hydrocarbon group" such as benzyl, 2-fluorobenzyl, 3-fluorobenzyl, 4-fluorobenzyl, 4-chlorobenzyl, 3,4-difluorobenzyl, 3,4-dichlorobenzyl, pentafluorobenzyl, 4-hydroxybenzyl, 4-methoxybenzyl, 3-trifluoromethylbenzyl, 4-aminobenzyl, 4-nitrobenzyl, 4-cyanobenzyl, phenethyl, etc.;

[0229] (2) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted $5-$ to 14 -membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms" such as 2-pyridylmethyl, 3-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, 2-thienylmethyl, 3-thienylmethyl, 4-thiazolylmethyl, etc.;

(3) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted C_{8-14} aromatic fused-ring group" such as 1-naphthylmethyl, 2-naphthylmethyl, inden-2-ylmethyl, etc.;

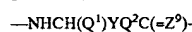
[0230] (4) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted $5-$ to 14 -membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms" such as 3-indolemethyl, 1-formylindol-3-ylmethyl, 3-benzo[b]thienylmethyl, 2-quinolylmethyl, etc.;

(5) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7 " such as cyclohexylmethyl, cyclopentylmethyl, indan-2-ylmethyl, etc.;

[0231] (6) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7 " such as 4-piperidinylmethyl, tetrahydrofurfuryl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydropyran-3-yl, indolin-3-yl, etc.; among others, preferred are benzyl, 2-fluorobenzyl, 3-fluorobenzyl, 4-fluorobenzyl, 4-hydroxybenzyl, 4-aminobenzyl, 4-nitrobenzyl, 4-chlorobenzyl,

4-methoxybenzyl, 4-cyanobenzyl, 3-trifluoromethylbenzyl, 3,4-dichlorobenzyl, 3,4-difluorobenzyl, pentafluorobenzyl, 3-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, 3-indolemethyl, 1-formylindol-3-ylmethyl, 3-benzo[b]thienylmethyl, 2-quinolylmethyl, 1-naphthylmethyl, 2-naphthylmethyl, cyclohexylmethyl, phenethyl, etc., and more preferably, benzyl, 2-fluorobenzyl, 3-fluorobenzyl, 4-fluorobenzyl, 4-hydroxybenzyl, 4-aminobenzyl, 4-nitrobenzyl, 4-chlorobenzyl, 4-methoxybenzyl, 4-cyanobenzyl, 3-trifluoromethylbenzyl, 3,4-dichlorobenzyl, 3,4-difluorobenzyl, pentafluorobenzyl, 3-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, 3-indolemethyl, 3-benzo[b]thienylmethyl, 1-naphthylmethyl, 2-naphthylmethyl, cyclohexylmethyl, etc.

[0232] X represents a group shown by formula:



(wherein, each symbol has the same significance as described above).

[0233] Q^1 represents a C_{1-4} alkyl group optionally substituted with a substituent selected from the group consisting of:

(1) an optionally substituted C_{6-12} aromatic hydrocarbon group;

(2) an optionally substituted $5-$ to 14 -membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms;

(3) an optionally substituted C_{8-14} aromatic fused-ring group;

(4) an optionally substituted $5-$ to 14 -membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms;

(5) an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7 ; and

(6) an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7 ; and the same substituents as in R^4 are used.

[0234] Examples of Q^1 include:

[0235] (1) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted C_{6-12} aromatic hydrocarbon group" such as benzyl, 2-fluorobenzyl, 3-fluorobenzyl, 4-fluorobenzyl, 4-chlorobenzyl, 3,4-difluorobenzyl, 3,4-dichlorobenzyl, pentafluorobenzyl, 4-hydroxybenzyl, 4-methoxybenzyl, 4-trifluoromethylbenzyl, 4-aminobenzyl, 4-nitrobenzyl, 4-cyanobenzyl, phenethyl, etc.;

[0236] (2) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted $5-$ to 14 -membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms" such as 2-pyridylmethyl, 3-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, 2-thienylmethyl, 3-thienylmethyl, 4-thiazolylmethyl, etc.;

(3) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted C_{8-14} aromatic fused-ring group" such as 1-naphthylmethyl, 2-naphthylmethyl, inden-2-ylmethyl, etc.

[0237] (4) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted $5-$ to 14 -membered aromatic fused heterocyclic

group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms" such as 3-indolemethyl, 1-formylindol-3-yl-methyl, 3-benzo[b]thienylmethyl, 2-quinolylmethyl, etc.;

(5) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7" such as cyclohexylmethyl, cyclopentylmethyl, indan-2-ylmethyl, etc.;

[0238] (6) "a C_{1-4} alkyl group having an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7" such as 4-piperidinylmethyl, tetrahydrofurfuryl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydropyran-3-yl, indolin-3-yl, etc.; preferably, cyclohexylmethyl, benzyl, 4-fluorobenzyl, 4-hydroxybenzyl, pentafluorobenzyl, 2-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, 1-naphthylmethyl, 2-naphthylmethyl, 3-indolemethyl, etc. and more preferably, benzyl, 4-fluorobenzyl, cyclohexylmethyl, etc.

[0239] Q^2 represents (1) CH_2 , which may optionally be substituted with an optionally substituted C_{1-4} alkyl group with a substituent selected from the group consisting of carbamoyl group and hydroxyl group, (2) NH, which may optionally be substituted with an optionally substituted C_{1-4} alkyl group with a substituent selected from the group consisting of carbamoyl group and hydroxyl group, or (3) O.

[0240] The " C_{1-4} alkyl group" used includes, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, etc.

[0241] Preferably, Q^2 is CH_2 , $CH(CH_3)$, $CH(CH_2OH)$, NH, or the like.

[0242] Y represents a group shown by formula: $-CONH-$, $-CSNH-$, $-CH_2NH-$, $-NHCO-$, $-CH_2O-$, $-CH_2S-$ or $-CH_2CH_2-$, which may optionally be substituted with a C_{1-6} alkyl group.

[0243] The " C_{1-6} alkyl group" used includes, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, etc.

[0244] Preferably, Y represents a group shown by formula: $-CONH-$, $-CSNH-$, $-NHCO-$ or $-CH_2NH-$.

[0245] Z^9 represents hydrogen atom, O or S and, among others O and S are preferred.

[0246] P represents:

(1) hydrogen atom;

(2) an optional amino acid residue continuously or discontinuously bound from the C-terminal end of the 1-48 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (54 amino acid residues of human metastatin);

(3) a group represented by formula: $J^1-J^2-C(J^3)(Q^3)Y^1C(J^4)(Q^4)Y^2C(J^5)(Q^5)Y^3C(J^6)(Q^6)C(=Z^{10})$ - (wherein each symbol has the same significance as described above);

(4) a group represented by formula: $-J^1-J^2-C(J^7)(Q^7)Y^2C(J^8)(Q^8)Y^3C(J^9)(Q^9)C(=Z^{10})$ - (wherein each symbol has the same significance as described above);

(5) a group represented by formula: $J^1-J^2-C(J^{10})(Q^{10})Y^3C(J^{11})(Q^{11})C(=Z^{10})$ - (wherein each symbol has the same significance as described above);

(6) a group represented by formula: $J^1-J^2-C(J^{12})(Q^{12})C(=Z^{10})$ - (wherein each symbol has the same significance as described above); or,

(7) a group represented by formula: J^1 - (wherein J^1 has the same significance as described above).

[0247] Specific examples of the "optional amino acid residue continuously or discontinuously bound from the C-terminal end of the 1-48 amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1" used include:

- (1) Asn
- (2) Trp Asn-,
- (3) Asn Trp Asn-,
- (4) Tyr Asn Trp Asn-,
- (5) Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (6) Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (7) Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (8) Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (9) Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (10) Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (11) Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (12) Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (13) Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (14) Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (15) Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (16) Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (17) Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (18) Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (19) Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (20) Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (21) Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (22) Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (23) Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (24) Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

-continued

- (25) Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val
Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr
Asn Trp Asn-,
- (26) His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala
Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn
Tyr Asn Trp Asn-,
- (27) Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly
Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro
Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (28) Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln
Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu
Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (29) Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro
Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp
Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (30) Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala
Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys
Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (31) Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro
Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu
Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (32) Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile
Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg
Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (33) Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln
Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln
Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (34) Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg
Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val
Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp
Asn-,
- (35) Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser
Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu
Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn
Trp Asn-,
- (36) Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His
Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val
Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr
Asn Trp Asn-,
- (37) Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro
His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala
Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn
Tyr Asn Trp Asn-,
- (38) Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala
Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly
Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro
Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (39) Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser
Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln
Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu
Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (40) Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu
Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro
Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp
Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (41) Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly
Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala
Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys
Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,

-continued

- (42) Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln Pro
Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro
Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu
Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (43) Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln
Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile
Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg
Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (44) Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln
Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln
Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln
Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn-,
- (45) Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg
Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg
Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu Val
Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp
Asn-,
- (46) Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser
Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser
Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val Leu
Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn
Trp Asn-,
- (47) Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly
Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His
Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala Val
Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr
Asn Trp Asn-,
- (48) Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser
Gly Ser Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro
His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly Ala
Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn
Tyr Asn Trp Asn-, and the like.

[0248] J¹ represents (a) hydrogen atom or (b) (i) a C₁₋₁₅ acyl group, (ii) a C₁₋₁₅ alkyl group, (iii) a C₆₋₁₄ aryl group, (iv) a carbamoyl group, (v) a carboxyl group, (vi) a sulfinio group, (vii) an amidino group or (viii) a glyoxyloyl group, which groups may optionally be substituted with a substituent containing an optionally substituted cyclic group.

[0249] The "cyclic group" used includes, for example, "an optionally substituted aromatic hydrocarbon group," "an optionally substituted aromatic heterocyclic group," "an optionally substituted aromatic fused-ring group," "an optionally substituted aromatic fused heterocyclic group," "an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group," "an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group", etc., and examples of the "aromatic hydrocarbon group," "aromatic heterocyclic group," "aromatic fused-ring group" and "aromatic fused heterocyclic group" used are the same as those given above.

[0250] The "non-aromatic cyclic hydrocarbon group" used includes a C₃₋₈ cycloalkyl group such as cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, etc.

[0251] The "non-aromatic heterocyclic group" used includes a 5- to 10-membered non-aromatic heterocyclic group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to 1 to 7 carbon atoms such as pyrrolidinyl (e.g., 1-pyrrolidinyl, 2-pyrrolidinyl, 3-pyrrolidinyl), oxazolidinyl (e.g., 2-oxazolidinyl), imidazolyl (e.g., 1-imidazolyl, 2-imidazolyl, 4-imidazolyl), piperidinyl (e.g., 1-piperidinyl,

2-piperidinyl, 3-piperidinyl, 4-piperidinyl), piperazinyl (e.g., 1-piperazinyl, 2-piperazinyl), morpholino, thiomorpholino, etc.

[0252] The substituent optionally present on the "cyclic group" includes the same substituents as the Substituent group A described above.

[0253] The " C_{1-15} acyl group" used includes, for example, formyl, a C_{1-14} alkyl-carbonyl (e.g., a C_{1-6} alkyl-carbonyl such as acetyl, propionyl, pivaloyl, etc.) and the like.

[0254] The " C_{1-15} alkyl group" used include, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonanyl, decanyl, etc.

[0255] The " C_{6-14} aryl group" used includes, for example, phenyl, 1-naphthyl, 2-naphthyl, biphenyl, etc.

[0256] (1) The C_{1-15} acyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group, includes (i) formyl, (ii) a C_{1-14} alkyl-carbonyl (e.g., a C_{1-6} alkyl-carbonyl such as acetyl, propionyl, pivaloyl, etc.), (iii) a C_{3-8} cycloalkyl-carbonyl (e.g., cyclopropylcarbonyl, cyclopentylcarbonyl, cyclohexylcarbonyl, 1-methylcyclohexylcarbonyl, etc.), (iv) a C_{3-8} cycloalkyl- C_{1-6} alkyl-carbonyl (e.g., cyclopropylacetyl, cyclopentylacetyl, cyclohexylacetyl, etc.), (v) a C_{6-14} aryl-carbonyl (e.g., benzoyl, 1-naphthoyl, 2-naphthoyl, etc.), a C_{6-14} aralkyl-carbonyl (e.g., phenylacetyl, 3-phenylpropionyl, etc.), (vi) a 5- to 7-membered monocyclic heterocyclic carbonyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms (e.g., nicotinoyl, isonicotinoyl, thenoyl, furoyl, morpholinocarbonyl, thiomorpholinocarbonyl, piperazin-1-ylcarbonyl, pyrrolidin-1-ylcarbonyl, etc.), (vii) a 5- to 7-membered monocyclic heterocyclic- C_{1-6} alkylcarbonyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms (e.g., 3-pyridylacetyl, 4-pyridylacetyl, 2-thienylacetyl, 2-furylacetyl, morpholinoacetyl, thiomorpholinoacetyl, piperidin-2-acetyl, pyrrolidine-2-ylacetyl, etc.), (viii) a 5- to 14-membered (preferably, 5- to 10-membered) bicyclic or tricyclic aromatic heterocyclic carbonyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to 3 to 11 carbon atoms (e.g., 2-indolecarbonyl, 3-indolecarbonyl, 2-quinolylcarbonyl, 1-isoquinolylcarbonyl, 2-benzo[b]thienylcarbonyl, 2-benzo[b]furanlycarbonyl, etc.), (ix) a 5- to 14-membered (preferably 5- to 10-membered) bicyclic or tricyclic aromatic heterocyclic- C_{1-6} alkylcarbonyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to 3 to 11 carbon atoms (e.g., 2-indoleacetyl, 3-indoleacetyl, 2-quinolylacetyl, 1-isoquinolylacetyl, 2-benzo[b]thienylacetyl, 2-benzo[b]furanlyacetyl, etc.), etc., among others, preferably used are acetyl, 2-indolecarbonyl, 3-indolecarbonyl, 3-indoleacetyl, 3-indolepropionyl, 2-indolinecarbonyl, 3-phenylpropionyl, diphenylacetyl, 2-pyridinecarbonyl, 3-pyridinecarbonyl, 4-pyridinecarbonyl, 1-pyridinioacetyl, 2-pyridineacetyl, 3-pyridineacetyl, 4-pyridineacetyl, 3-(1-pyridinio)propionyl, 3-(pyridin-2-yl)propionyl, 3-(pyridin-3-yl)propionyl, 3-(pyridin-4-yl)propionyl, 4-imidazoleacetyl, cyclohexanecarbonyl, 1-piperidineacetyl, 1-methyl-1-piperidinoacetyl, 4-piperidinecarbonyl, 2-pyrimidinecarbonyl, 4-pyrimidinecarbonyl, 5-pyrimidinecarbonyl, 2-pyrimidineacetyl, 4-py-

rimidineacetyl, 5-pyrimidineacetyl, 3-(pyrimidin-2-yl)propionyl, 3-(pyrimidin-4-yl)propionyl, 3-(pyrimidin-5-yl)propionyl, butanoyl, hexanoyl, octanoyl, D-glucuronoyl, amino-(4-hydroxyphenyl)acetyl), etc.

[0257] (2) The C_{1-15} alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group, includes, for example, (i) a mono- or di- C_{1-15} alkyl (e.g., methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonanyl, decanyl), (ii) a mono- or di- C_{3-8} cycloalkyl (e.g., cyclopropyl, cyclopentyl, etc.), (iii) a mono- or di- C_{3-8} cycloalkyl- C_{1-7} alkyl (e.g., cyclopropylmethyl, cyclopentylmethyl, cyclohexylethyl, etc.), (iv) a mono- or di- C_{7-15} aralkyl (e.g., benzyl, phenethyl, etc.), (v) a mono- or di-5- to 7-membered monocyclic heterocyclic- C_{1-6} alkyl group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms (e.g., 3-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, 2-thienylmethyl, furfuryl, etc.), (vi) a mono- or di-5- to 14-membered (preferably, 5- to 10-membered) bicyclic or tricyclic aromatic heterocyclic- C_{1-6} alkyl group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to 3 to 11 carbon atoms (e.g., 2-indolemethyl, 3-indolemethyl, 3-(indol-3-yl)propyl, 2-quinolylmethyl, 1-isoquinolylmethyl, 2-benzo[b]thienylmethyl, 2-benzo[b]furanlymethyl, etc.), etc.; among others, methyl, ethyl, benzyl, 3-(indol-3-yl)propyl, etc. are preferably used.

[0258] (3) The C_{6-14} aryl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group, includes, for example, a C_{6-14} aryl group (e.g., phenyl, naphthyl, biphenyl), which may optionally be substituted with (i) a C_{6-14} carbocyclic group (e.g., cycloalkyl, phenyl, 1-naphthyl, 2-naphthyl, etc.), (ii) a 5- to 7-membered monocyclic heterocyclic group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms (e.g., 3-pyridyl, 2-thienyl, etc.), (iii) a 5- to 14-membered (preferably, 5- to 10-membered) bicyclic or tricyclic aromatic heterocyclic group containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to 3 to 11 carbon atoms (e.g., 2-indolyl, 3-indolyl, 2-quinolyl, 1-isoquinolyl, 2-benzo[b]thienyl, 2-benzo[b]furanlyl, etc.), etc.

[0259] (4) The optionally substituted carbamoyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group, includes (i) carbamoyl, (ii) a mono- or di- C_{1-15} alkylcarbamoyl group (e.g., methylcarbamoyl, ethylcarbamoyl), (iii) a mono- or di- C_{3-8} cycloalkylcarbamoyl (e.g., cyclopropylcarbamoyl, cyclopentylcarbamoyl, cyclohexylcarbamoyl, etc.), (iv) a mono- or di- C_{3-8} cycloalkyl- C_{1-6} alkyl-carbamoyl (e.g., cyclopropylmethylcarbamoyl, cyclopentylmethylcarbamoyl, 2-cyclohexylethylcarbamoyl, etc.) (v) a mono- or di- C_{6-14} aryl-carbamoyl (e.g., phenylcarbamoyl, etc.), a mono- or di- C_{6-14} aralkyl-carbamoyl (e.g., benzylcarbamoyl, phenethylcarbamoyl, etc.), (vi) a mono- or di-5- to 7-membered monocyclic heterocyclic carbamoyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms (e.g., 3-pyridinecarbamoyl, 2-thiophenecarbamoyl, piperidin-3-ylcarbamoyl, etc.), (vii) a mono- or di-5- to 7-membered monocyclic heterocyclic- C_{1-6} alkylcarbamoyl containing 1 to 4 hetero atoms of

1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to carbon atoms (e.g., 3-pyridylmethylcarbamoyl, 2-(pyridin-2-yl)ethylcarbamoyl, 2-(piperidin-1-yl)ethylcarbamoyl, etc.), (viii) a mono- or di-5- to 14-membered (preferably, 5- to 10-membered) bicyclic or tricyclic aromatic heterocyclic carbamoyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to 3 to 11 carbon atoms (e.g., 4-indolecarbamoyl, 5-indolecarbamoyl, 3-quinolylcarbamoyl, 5-quinolylcarbamoyl, etc.), (ix) a mono- or di-5- to 14-membered (preferably, 5- to 10-membered) bicyclic or tricyclic aromatic heterocyclic-C₁₋₆ alkylcarbonyl containing 1 to 4 hetero atoms of 1 or 2 members selected from nitrogen, sulfur and oxygen atoms in addition to 3 to 11 carbon atoms (e.g., benzimidazol-2-ylmethylcarbamoyl, 2-(indol-3-yl)ethylcarbamoyl, etc.), (x) a 5- to 7-membered cyclic carbamoyl (e.g., 1-pyrrolidinylcarbonyl, 1-piperidinylcarbonyl, hexamethyleiminocarbonyl, etc.), (xi) a C₁₋₁₅ acylcarbamoyl (the C₁₋₁₅ acyl herein has the same significance as the "C₁₋₁₅ acyl group" in the "C₁₋₁₅ acyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group"), (xii) a C₁₋₅ alkylaminocarbamoyl (the C₁₋₅ alkyl herein has the same significance as the "C₁₋₅ alkyl group" in the "C₁₋₁₅ alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group"), (xiii) a C₆₋₁₄ arylaminocarbamoyl (the C₆₋₁₄ aryl group herein has the same significance as the "C₆₋₁₄ aryl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group"), etc.; among others, 2-(indol-3-yl)ethylcarbamoyl, etc. are preferably used.

[0260] (5) The carboxyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group, includes (i) a C₁₋₁₅ alkylloxycarbonyl (the C₁₋₁₅ alkyl herein has the same significance as the "C₁₋₁₅ alkyl group" in the "C₁₋₁₅ alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group," e.g., tert-butyloxycarbonyl, benzyloxycarbonyl, 9-fluorenylmethoxycarbonyl), (ii) a C₆₋₁₄ arylloxycarbonyl (the C₆₋₁₄ aryl herein has the same significance as the "C₆₋₁₄ aryl group" in the "C₆₋₁₄ aryl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group," e.g., phenoxycarbonyl), etc.

[0261] (6) The sulfinio group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group, includes (i) a C₁₋₁₅ alkylsulfonyl (the C₁₋₁₅ alkyl herein has the same significance as the "C₁₋₁₅ alkyl group" in the "C₁₋₁₅ alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group," e.g., benzylsulfonyl), (ii) a C₆₋₁₄ arylsulfonyl (the C₆₋₁₄ aryl herein has the same significance as the "C₆₋₁₄ aryl group" in the "C₆₋₁₄ aryl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group," e.g., tosyl), etc.

[0262] (7) The amidino group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group, includes (i) amidino, (ii) a C₁₋₁₅ alkylamidino (the C₁₋₁₅ alkyl herein has the same significance as the "C₁₋₁₅ alkyl group" in the "C₁₋₁₅ alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group," e.g., N-methylamidino), (iii) a C₁₋₁₅ acylamidino (the C₁₋₁₅ acyl herein has the same significance as the "C₁₋₁₅ acyl group" in the "C₁₋₁₅ acyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group," e.g., N-acetylamidino), etc.

[0263] (8) The glyoxyloyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group, includes (i) a C₁₋₁₅ alkylloxalyl (the C₁₋₁₅ alkyl herein has the same significance as the "C₁₋₁₅ alkyl group" in the "C₁₋₁₅ alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group," e.g., ethyloxalyl), (ii) a C₆₋₁₄ arylloxalyl (the C₆₋₁₄ aryl herein has the same significance as the "C₆₋₁₄ aryl group" in the "C₆₋₁₄ aryl group, which may optionally be substituted with a substituent containing a cyclic group," e.g., phenyloxalyl), etc.

[0264] Among those described above, J¹ is preferably hydrogen atom, acetyl, 3-indolecarbonyl, 3-(indol-3-yl)propionyl, 3-phenylpropionyl, diphenylacetyl, 3-(pyridin-3-yl)propionyl, 4-imidazoleacetyl, cyclohexanecarbonyl, 1-piperidineacetyl, 1-methyl-1-piperidinoacetyl, 4-piperidinecarbonyl, hexanoyl, amino-(4-hydroxyphenyl)acetyl, D-glucuronyl, 2-(indol-3-yl)ethylcarbamoyl, tert-butyloxycarbonyl, 9-fluorenylmethoxycarbonyl, amidino, etc.; among others, preferred are hydrogen atom, acetyl, 3-indolecarbonyl, 3-(indol-3-yl)propionyl, 3-phenylpropionyl, 3-(pyridin-3-yl)propionyl, 4-imidazoleacetyl, cyclohexanecarbonyl, hexanoyl, amino-(4-hydroxyphenyl)acetyl, 2-(indol-3-yl)ethylcarbamoyl, 9-fluorenylmethoxycarbonyl, amidino, etc.

[0265] J² represents (1) NH optionally substituted with a C₁₋₆ alkyl group, (2) CH₂ optionally substituted with a C₁₋₆ alkyl group, (3) O or (4) S.

[0266] The "C₁₋₆ alkyl group" used includes methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, etc.

[0267] Preferably, J² is NH.

[0268] Each of J³ through J¹² represents hydrogen atom or a C₁₋₃ alkyl group.

[0269] The "C₁₋₃ alkyl group" used includes methyl, ethyl, propyl, isopropyl, etc.

[0270] Preferably, J³ is hydrogen atom.

[0271] Preferably, J⁴ is hydrogen atom.

[0272] Preferably, J⁵ is hydrogen atom.

[0273] Preferably, J⁶ is hydrogen atom.

[0274] Preferably, J⁷ is hydrogen atom.

[0275] Preferably, J⁸ is hydrogen atom.

[0276] Preferably, J⁹ is hydrogen atom.

[0277] Preferably, J¹⁰ is hydrogen atom.

[0278] Preferably, J¹¹ is hydrogen atom.

[0279] Preferably, J¹² is hydrogen atom.

[0280] Each of Q³ through Q¹² represents a C₁₋₄ alkyl group, which may optionally have a substituent selected from the group consisting of:

(1) an optionally substituted C₆₋₁₂ aromatic hydrocarbon group;

(2) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms;

(3) an optionally substituted C₈₋₁₄ aromatic fused-ring group;

(4) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms;

(5) an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7;

(6) an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7;

(7) an optionally substituted amino group;

(8) an optionally substituted guanidino group;

(9) an optionally substituted hydroxyl group;

(10) an optionally substituted carboxyl group;

(11) an optionally substituted carbamoyl group; and,

(12) an optionally substituted sulfhydryl group.

[0281] Particularly preferred Q³ to Q⁶ are a C₁₋₄ alkyl group having a substituent selected from the group consisting of:

(1) an optionally substituted C₆₋₁₂ aromatic hydrocarbon group;

(2) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms;

(3) an optionally substituted C₈₋₁₄ aromatic fused-ring group;

(4) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms;

(5) an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7;

(6) an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7;

(7) an optionally substituted amino group;

(8) an optionally substituted guanidino group;

(9) an optionally substituted hydroxyl group;

(10) an optionally substituted carboxyl group;

(11) an optionally substituted carbamoyl group; and,

(12) an optionally substituted sulfhydryl group.

[0282] The "optionally substituted C₆₋₁₂ aromatic hydrocarbon group," "optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms," "optionally substituted C₈₋₁₄ aromatic fused-ring group," "optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms," "optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7" and

"optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7" used are the same as those given above.

[0283] (1) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted C₆₋₁₂ aromatic hydrocarbon group, there are used, for example, benzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-chlorobenzyl, 3-chlorobenzyl, 4-chlorobenzyl, 4-aminobenzyl, etc.

[0284] (2) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms, there are used, for example, 2-pyridylmethyl, 3-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, 4-imidazolymethyl, etc.

[0285] (3) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted C₈₋₁₄ aromatic fused-ring group, there are used, for example, 1-naphthylmethyl, 2-naphthylmethyl, etc.

[0286] (4) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms, there are used, for example, 3-indolymethyl, 1-formylindol-3-ylmethyl, 2-quinolylmethyl, etc.

[0287] (5) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7, there are used, for example, cyclohexylmethyl, etc.

[0288] (6) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7, there are used, for example, piperidin-1-ylmethyl, etc.

[0289] (7) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted amino group, there are used, for example, 2-aminoethyl, 3-aminopropyl, 4-aminobutyl, 4-acetamidobutyl, etc.

[0290] (8) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted guanidino group, there are used, for example, 3-guanidinopropyl, 3-(N-tosyl)guanidinopropyl, etc.

[0291] (9) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted hydroxyl group, there are used, for example, hydroxymethyl, 1-hydroxyethyl, benzyloxymethyl, etc.

[0292] (10) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted carboxyl group, there are used, for example, carboxymethyl, 2-carboxylethyl, benzyloxycarbonylmethyl, etc.

[0293] (11) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted carbamoyl group, there are used, for example, carbamoylmethyl, 2-carbamoylethyl, xanthylcarbamoyl, etc.

[0294] (12) As the C₁₋₄ alkyl group having an optionally substituted sulfhydryl group, there are used, for example, sulfhydrylmethyl, 2-(methylsulfhydryl)ethyl, etc.

[0295] (13) As the unsubstituted C₁₋₄ alkyl group, there are used, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, etc.

[0296] Examples of Q³, which is preferably used, include 4-hydroxybenzyl, 3-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, methyl, isobutyl, hydroxymethyl, carboxymethyl, 4-ami-

nobutyl, etc., and more preferably, 4-hydroxybenzyl, 3-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, etc.

[0297] Examples of Q^4 , which is preferably used, include carbamoylmethyl, 2-carbamoylethyl, 4-hydroxybenzyl, 4-imidazolemethyl, isobutyl, hydroxymethyl, 1-hydroxyethyl, carboxymethyl, 4-aminobutyl, etc., and more preferably, carbamoylmethyl, 2-carbamoylethyl, 4-hydroxybenzyl, etc.

[0298] Examples of Q^5 , which is preferably used, include benzyl, 2-chlorobenzyl, 3-chlorobenzyl, 4-chlorobenzyl, 4-aminobenzyl, 2-pyridylmethyl, 3-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, 1-naphthylmethyl, 2-naphthylmethyl, 3-indolemethyl, 1-formylindol-3-ylmethyl, 2-quinolylmethyl, cyclohexylmethyl, hydroxymethyl, 1-hydroxyethyl, methyl, isopropyl, isobutyl, sec-butyl, carboxymethyl, 4-aminobutyl, etc., and more preferably, benzyl, 2-chlorobenzyl, 3-chlorobenzyl, 4-chlorobenzyl, 4-aminobenzyl, 2-pyridylmethyl, 3-pyridylmethyl, 4-pyridylmethyl, 1-naphthylmethyl, 2-naphthylmethyl, 3-indolemethyl, 2-quinolylmethyl, cyclohexylmethyl, 1-hydroxyethyl, isopropyl, isobutyl, sec-butyl, etc.

[0299] Q^6 is particularly preferably methyl, hydroxymethyl, 1-hydroxyethyl, carbamoylmethyl, 2-carbamoylethyl, etc., and more preferably, carbamoylmethyl, etc.

[0300] Q^7 is particularly preferably 4-hydroxybenzyl, carbamoylmethyl, 3-pyridylmethyl, etc., and more preferably, 4-hydroxybenzyl, etc.

[0301] Q^8 is particularly preferably benzyl, 4-pyridylmethyl, 2-naphthylmethyl, 3-indolemethyl, hydroxymethyl, cyclohexylmethyl, sec-butyl, 1-hydroxyethyl, etc., and more preferably, 4-pyridylmethyl, 3-indolemethyl, sec-butyl, etc.

[0302] Q^9 is particularly preferably carbamoylmethyl, etc.

[0303] Q^{10} is particularly preferably 4-hydroxybenzyl, 3-indolemethyl, methyl, 1-hydroxyethyl, 3-guanidinopropyl, etc., and more preferably, 3-indolemethyl, etc.

[0304] Q^{11} is particularly preferably carbamoylmethyl, etc.

[0305] Q^{12} is particularly preferably carbamoylmethyl, etc.

[0306] Each of Y^1 through Y^3 represents a group shown by formula: $-\text{CON}(J^{13})-$, $-\text{CSN}(J^{13})-$, $-\text{C}(J^{14})\text{N}(J^{13})-$ or $-\text{N}(J^{13})\text{CO}-$ (wherein each of J^{13} and J^{14} represents hydrogen atom or a C_{1-3} alkyl group).

[0307] As the C_{1-3} alkyl group shown by J^{13} and J^{14} , methyl, ethyl, propyl or isopropyl is used.

[0308] J^{13} is preferably hydrogen atom.

[0309] J^{14} is preferably hydrogen atom.

[0310] Y^1 is preferably a group shown by formula: $-\text{CONH}-$ or $-\text{CH}_2\text{NH}-$, etc.

[0311] Y^2 is preferably a group shown by formula: $-\text{CONH}-$ or $-\text{CH}_2\text{NH}-$, etc.

[0312] Y^3 is preferably a group shown by formula: $-\text{CONH}-$, etc.

[0313] J^3 and Q^3 , J^4 and Q^4 , J^5 and Q^5 , J^6 and Q^6 , J^7 and Q^7 , J^8 and Q^8 , J^9 and Q^9 , J^{10} and Q^{10} , J^{11} and Q^{11} , and J^{12} and Q^{12} may be combined together to form a ring. In this

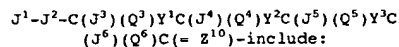
case, $C(J^3)(Q^3)$, $C(J^4)(Q^4)$, $C(J^5)(Q^5)$, $C(J^6)(Q^6)$, $C(J^7)(Q^7)$, $C(J^8)(Q^8)$, $C(J^9)(Q^9)$, $C(J^{10})(Q^{10})$, $C(J^{11})(Q^{11})$ or $C(J^{12})(Q^{12})$ may form, for example, cyclopentane, cyclohexane, piperidine, etc.

[0314] J^2 and Q^3 , Y^1 and Q^4 , Y^2 and Q^5 , Y^3 and Q^6 , J^2 and Q^7 , Y^2 and Q^8 , Y^3 and Q^9 , J^2 and Q^{10} , Y^3 and Q^{11} , and J^2 and Q^{12} may be combined together to form a ring.

[0315] In the case where J^2 and Q^3 , J^2 and Q^7 , J^2 and Q^{10} , or J^2 and Q^{12} are combined together to form a ring, $J^2-C(J^3)(Q^3)$, $J^2-C(J^7)(Q^7)$, $J^2-C(J^{10})(Q^{10})$, or $J^2-C(J^{12})(Q^{12})$ may form, for example, pyrrolidine, piperidine, thiazolidine.

[0316] In the case where Y^1 and Q^4 , Y^2 and Q^5 , Y^3 and Q^6 , Y^2 and Q^8 , Y^3 and Q^9 , and Y^3 and Q^{11} are combined together to form a ring, $Y^1C(J^4)(Q^4)$, $Y^2C(J^5)(Q^5)$, $Y^3C(J^6)(Q^6)$, $Y^2C(J^8)(Q^8)$, $Y^3C(J^9)(Q^9)$, or $Y^3C(J^{11})(Q^{11})$ may form, for example, pyrrolidine-2-carbonyl, piperidine-2-carbonyl or thiazolidine-4-carbonyl.

[0317] Preferred examples of the group shown by formula:



Tyr Asn Trp Asn-,
Tyr Asn Trp D-Asn-,
Tyr Asn D-Trp Asn-,
Tyr D-Asn Trp Asn-,
D-Tyr Asn Trp Asn-,
Tyr Lys Trp Asn-,
Tyr Asp Trp Asn-,
Tyr Tyr Trp Asn-,
Tyr Leu Trp Asn-,
Tyr Asn Ala Asn-,
Tyr Asn Leu Asn-,
Tyr Asn Ser Asn-,
Tyr Asn Asp Asn-,
Tyr Asn Lys Asn-,
Ala Asn Trp Asn-,
Leu Asn Trp Asn-,
Ser Asn Trp Asn-,
Asp Asn Trp Asn-,
Lys Asn Trp Asn-,
Tyr Asn Trp(For) Asn-,
D-Tyr Asn D-Trp Asn-,
D-Tyr Asn Ala Asn-,
D-Tyr Asn Ser Asn-,
D-Tyr Asn Cha Asn-,

-continued

$J^1-J^2-C(J^3)(Q^3)Y^1C(J^4)(Q^4)Y^2C(J^5)(Q^5)Y^3C(J^6)(Q^6)C(=Z^{10})$ -include:
D-Tyr Asn Thr Asn-,
D-Tyr Asn Ile Asn-,
D-Tyr Gln Trp Asn-,
D-Tyr Thr Trp Asn-,
D-Tyr Asn Val Asn-,
D-Tyr D-Asn Trp Asn-,
D-Tyr D-Asn D-Trp Asn-,
D-Tyr Asn Phe Asn-,
D-Tyr Asn Nal(1) Asn-,
D-Tyr Asn Nal(2) Asn-,
D-Tyr Asn Phe(2Cl) Asn-,
D-Tyr Asn Phe(3Cl) Asn-,
D-Tyr Asn Phe(4Cl) Asn-,
D-Tyr Asn Phe(4NH ₂) Asn-,
D-Tyr Asn Pya(3) Asn-,
D-Tyr D-Asn Phe Asn-,
D-Tyr D-Asn Cha Asn-,
D-Tyr D-Asn Thr Asn-,
D-Tyr Asn Pya(2) Asn-,
D-Tyr Asn Pya(4) Asn-,
D-Tyr D-Ser Trp Asn-,
D-Tyr D-His Trp Asn-,
D-Pya(3) D-Asn Cha Asn-,
D-Pya(3) D-Tyr Cha Asn-,
TyrΨ(CH ₂ NH)Asn Trp Asn-,
D-Tyr AsnΨ(CH ₂ NH) Trp Asn-,
TyrΨ(CH ₂ NH)Asn D-Trp Asn-,
D-Tyr Asn Ala(2-Qui) Asn-,
D-Tyr Asn D-Pya(4) Asn-,
D-Tyr D-Asn Pya(4) Asn-,
Tyr D-Asn Cha Asn-,
D-Tyr D-Asn Thr Asn-,
D-Tyr D-Asn Pya(4) Asn-, etc.

[0318] Preferred examples of the group shown by formula:

$J^1J^2-C(J^7)(Q^7)Y^2C(J^8)(Q^8)Y^2C(J^9)(Q^9)C(=Z^{10})$ -include:
Fmoc Asn Trp Asn-,
D-Asn Trp Asn-,
D-Tyr Trp Asn-,
D-Tyr D-Trp Asn-,
D-Tyr Ser Asn-,
D-Tyr Thr Asn-,
D-Tyr Ile Asn-,
D-Tyr Phe Asn-,
D-Tyr Nal(2) Asn-,
D-Pya(3) Phe Asn-,
D-Pya(3) Trp Asn-,
D-Tyr D-Pya(4) Asn-,
D-Asn Cha Asn-, etc.

[0319] Preferred examples of the group shown by formula:

$J^1-J^2-C(J^{10})(Q^{10})Y^3C(J^{11})(Q^{11})C(=Z^{10})$ -include:
Fmoc Trp Asn-,
Boc Tyr Asn-,
Tyr Asn-,
D-Trp Asn-,
Ac Trp Asn-,
Amidino Trp Asn-,
Ac Ala Asn-,
Ac Arg Asn-,
Ac Thr Asn-, etc.

[0320] Preferred examples of the group shown by formula:
 $J^1-J^2-C(J^{12})(Q^{12})C(=Z^{10})$ - include:

Fmoc Asn-,
 3-(Indol-3-yl)propionyl Asn-,
 3-Indolecarbonyl Asn-,
 3-Indoleacetyl Asn-,
 4-(Indol-3-yl)butyryl Asn-,
 Diphenylacetyl Asn-,
 Hexanoyl Asn-,
 Cyclohexanecabonyl Asn-,

2-(Indol-3-yl)ethylcabamoyl Asn-,

3-Pyridylpropionyl Asn-,

4-Imidazoleacetyl Asn-,

Piperidinecarbonyl Asn-,

1-Piperidineacetyl Asn-,

1-Methyl-1-piperidinoacetyl Asn-,

1-Pyridinioacetyl Asn-,

D-Glucuronyl Asn-, etc.

[0321] Preferred examples of the group shown by formula: J¹- include hydrogen atom, etc.

[0322] In the metastatin derivatives (I) of the present invention, all compounds in which the groups shown by the respective symbols are optionally combined are preferably used. Among others, the compounds shown by Compound Numbers below (Tables 1 through 11) are preferred.

MS10 :Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Compound No. 17:[Pya(4)10]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Pya(4)-NH₂

Compound No. 18:[Tyr(Me)10]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr(Me)-NH₂

Compound No. 19:[Phe(2F)10]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(2F)-NH₂

Compound No. 23:[Tyr5]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Tyr-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 24:[Leu5]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Leu-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 30:Acetyl-MS10
 Acetyl-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 31:Fmoc-MS10
 Fmoc-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 38:[D-Ser5]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-D-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 39:[D-Asn4]MS10
 Tyr-Asn-Trp-D-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 40:[D-Trp3]MS10
 Tyr-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 41:[D-Asn2]MS10
 Tyr-D-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 42:[D-Tyr1]MS10
 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 44:[Lys9]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Lys-Phe-NH₂

Compound No. 45:[Ala8]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Ala-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 50:[Ala7]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Ala-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 51:[NMePhe10]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-NMePhe-NH₂

-continued

Compound No. 53:des(1-3)-Fmoc-MS10
 Fmoc-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 54:des(1-2)-Fmoc-MS10
 Fmoc-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 55:des(1)-Fmoc-MS10
 Fmoc-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 56:[Lys2]MS10
 Tyr-Lys-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 57:[Asp2]MS10
 Tyr-Asp-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 58:[Tyr2]MS10
 Tyr-Tyr-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 59:[Leu2]MS10
 Tyr-Leu-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 60:[Pya(3)10]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Pya(3)-NH₂

Compound No. 61:[Phe(4F)10]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(4F)-NH₂

Compound No. 67:[Ala3]MS10
 Tyr-Asn-Ala-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 68:[Leu3]MS10
 Tyr-Asn-Leu-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 69:[Ser3]MS10
 Tyr-Asn-Ser-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 70:[Asp3]MS10
 Tyr-Asn-Asp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 71:[Lys3]MS10
 Tyr-Asn-Lys-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 72:[Ala1]MS10
 Ala-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 73:[Leu1]MS10
 Leu-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 74:[Ser1]MS10
 Ser-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 75:[Asp1]MS10
 Asp-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 76:[Lys1]MS10
 Lys-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 77:[Phe(4CN)10]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(4CN)-NH₂

Compound No. 78:[Trp(For) 3, Phe(4CN)10]MS10
 Tyr-Asn-Trp(For)-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(4CN)-NH₂

Compound No. 79:[Hph10]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Hph-NH₂

Compound No. 81:[NMeArg9]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-NMeArg-Phe-NH₂

Compound No. 82:[Arg(Me)9]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 83:[Arg(asy Me₂)9]MS10
 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(asy Me₂)-Phe-NH₂

-continued

Compound No. 87:des(4-5)-Boc-MS10
Boc-Tyr-Asn-Trp-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 88:des(4-5)-MS10
Tyr-Asn-Trp-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 90:[9Ψ10, CH₂NH]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-ArgΨ(CH₂NH)Phe-NH₂

Compound No. 91:[8Ψ9, CH₂NH]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-LeuΨ(CH₂NH)Arg-Phe-NH₂

Compound No. 97:[Har9]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Har-Phe-NH₂

Compound No. 98:[Lys(Me)₂]9MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Lys(Me)₂-Phe-NH₂

Compound No. 101:[Ser7]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Ser-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 105:[Nle8]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Nle-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 107:[Val8]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Val-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 109:[Tyr10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH₂

Compound No. 110:[Nal(2)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Nal(2)-NH₂

Compound No. 111:[Phe(F₅)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(F₅)-NH₂

Compound No. 112:[Cha10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Cha-NH₂

Compound No. 114:des(1-3)-3-(3-Indolyl)propionyl-MS10
3-(3-Indolyl)propionyl-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 121:des(1-4)-[Trp5]MS10
Trp-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 123:[NMeLeu8]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-NMeLeu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 126:[NMeSer5]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-NMeSer-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 127:[D-Asn4, NMePhe6]MS10
Tyr-Asn-Trp-D-Asn-Ser-NMePhe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 128:[10Ψ, CSNH]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-PheΨ(CSNH)NH₂

Compound No. 129:[Arg(symMe₂)9]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(SymMe₂)-Phe-NH₂

Compound No. 130:[Phe(4Cl)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(4Cl)-NH₂

Compound No. 131:[Phe(4NH₂)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(4NH₂)-NH₂

Compound No. 132:[Phe(4NO₂)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(4NO₂)-NH₂

Compound No. 133:[Nal(1)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Nal(1)-NH₂

-continued

Compound No. 134:[Trp10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Trp-NH₂

Compound No. 137:[Nle9]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Nle-Phe-NH₂

Compound No. 138:[Cit9]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Cit-Phe-NH₂

Compound No. 140:[Arg(Me)9, NMePhe10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-NMePhe-NH₂

Compound No. 141:[D-Tyr1, Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 142:[D-Tyr1, D-Trp3, Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 143:[D-Trp3, Arg(Me)9]MS10
Tyr-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 144:des(1-3)-Fmoc-[Arg(Me)9]MS10
Fmoc-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 145:des(1-2)-Fmoc-[Arg(Me)9]MS10
Fmoc-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 146:[10Ψ, CSNH, D-Tyr1]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-PheΨ(CSNH)NH₂

Compound No. 150:[Tyr6]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 151:[Nal(1)6]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Nal(1)-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 152:[Nal(2)6]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Nal(2)-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 153:[Phe(F₅)6]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe(F₅)-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 154:[Phe(4F)6]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe(4F)-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 156:[Cha6]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Cha-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 163:[6Ψ7, CH₂NH]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheΨ(CH₂NH)Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 165:[Dap(Gly)9]-MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Dap(Gly)-Phe-NH₂

Compound No. 166:[6Ψ7, CSNH]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe Ψ(CSNH)Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 169:[D-Tyr1, Ala3, Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Ala-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 170:[D-Tyr1, Ser3, Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Ser-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 171:[D-Tyr1, Cha3, Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 172:[D-Tyr1, Cha6, Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Cha-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 173:[D-Tyr1, Ala7, Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Ala-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

-continued

Compound No. 174:[D-Tyr1,Arg(Me)9,Trp10]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂

Compound No. 176:[AzaGly7]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 181:[D-Tyr1,Cha3,6,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Cha-Asn-Ser-Cha-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 182:[D-Tyr1,Cha3,6,Arg(Me)9,Trp10]MS10
D-Tyr-Asn-Cha-Asn-Ser-Cha-Gly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂

Compound No. 183:[Phe(4NH₂)9]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Phe(4NH₂)-Phe-NH₂

Compound No. 184:[Phe(4-Guanidino)9]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Phe(4-Guanidino)-Phe-NH₂

Compound No. 185:[Dap(GnGly)9]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Dap(GnGly)-Phe-NH₂

Compound No. 186:[Trp(For)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Trp(For)-NH₂

Compound No. 187:[Abu8]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Abu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 189:[Ala(3-Bzt)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Ala(3-Bzt)-NH₂

Compound No. 190:[D-Tyr1,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 191:[D-Tyr1,Ser3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Ser-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 192:[D-Tyr1,Arg(Et)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Et)-Phe-NH₂

Compound No. 193:[D-Tyr1,Arg(n-Pr)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(n-Pr)-Phe-NH₂

Compound No. 194:[D-Tyr1,Arg(Ac)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Ac)-Phe-NH₂

Compound No. 197:[Phe(3F)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(3F)-NH₂

Compound No. 198:[Phe(3,4F₂)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(3,4F₂)-NH₂

Compound No. 199:[Phe(3,4Cl₂)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(3,4Cl₂)-NH₂

Compound No. 200:[Phe(3CF₃)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe(3CF₃)-NH₂

Compound No. 201:[Ala(2-Qui)10]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Ala(2-Qui)-NH₂

Compound No. 203:[D-Tyr1,Cha6,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Cha-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 204:[D-Tyr1,Ala7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Ala-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 205:[D-Tyr1,Thr3,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Thr-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

-continued

Compound No. 206:[D-Tyr1,Ile3,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Ile-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 207:[D-Tyr1,Ser4,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Ser-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 208:[D-Tyr1,Thr4,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Thr-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 209:[D-Tyr1,Gln4,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Gln-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 210:[D-Tyr1,Ala4,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Ala-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 211:[D-Tyr1,Thr5,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Thr-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 212:[D-Tyr1,Ala5,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ala-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 213:[D-Tyr1,Val8,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Val-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 214:[D-Tyr1,Gln2,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Gln-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 215:[D-Tyr1,Thr2,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Thr-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 216:des(1)-[D-Asn2,Arg(Me)9]MS10
D-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 217:des(1)-[D-Tyr2,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 218:[N((CH₂)₃Gn)Gly9]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-N((CH₂)₃Gn)Gly-Phe-NH₂

Compound No. 220:[Arg(Et)9]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Et)-Phe-NH₂

Compound No. 221:[D-Tyr1,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Thr-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 222:des(1)-[D-Tyr2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 223:des(1-2)-[D-Trp3,Arg(Me)9]MS10
D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 224:des(1)-[D-Tyr2,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 225:des(1)-[D-Asn2,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10
D-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 226:des(1)-[D-Tyr2,Ser3,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Ser-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 227:des(1)-[D-Tyr2,Thr3,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Thr-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 228:des(1)-[D-Tyr2,Ile3,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Ile-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 229:[D-Tyr1,Val3,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Val-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

-continued

Compound No. 230:[D-Tyr1,D-Asn2,Arg(Me)9]
MS10
D-Tyr-D-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 231:[D-Tyr1,D-Asn2,D-Trp3,Arg(Me)9]
MS10
D-Tyr-D-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 232:[D-Tyr1,AzaGly7,Arg(Me)9]
MS10
D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 233:[D-Tyr1,Ile3,AzaGly7,Arg(Me)9]
MS10
D-Tyr-Asn-Ile-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 234:[D-Tyr1,Val3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Val-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 235:[D-Tyr1,Ala3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Ala-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 236:[D-Tyr1,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]
MS10
D-Tyr-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 237:[D-Tyr1,D-Asn2,AzaGly7,Arg(Me)9]
MS10
D-Tyr-D-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 238:[D-Tyr1,D-Asn2,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-D-Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 239:des(1)-[D-Tyr2,Ser3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Ser-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 240:des(1)-[D-Tyr2,Ile3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Ile-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 241:des(1)-[D-Tyr2,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Thr-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 242:des(1)-[D-Tyr2,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 244:[D-Tyr1,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]
MS10
D-Tyr-Asn-Phe-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 245:[D-Tyr1,Nal(1)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Nal(1)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 246:[D-Tyr1,Nal(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Nal(1)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

-continued

Compound No. 247:[D-Tyr1,Phe(2CL)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Phe(2CL)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 248:[D-Tyr1,Phe(3CL)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Phe(3CL)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 249:[D-Tyr1,Phe(4CL)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Phe(4CL)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 250:[D-Tyr1,Phe(4NH₂)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Phe(4NH₂)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 251:[D-Tyr1,Pya(3)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Asn-Pya(3)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 252:[D-Tyr1,D-Ala3,AzaGly7,Arg(Me)9]
MS10
D-Tyr-Asn-D-Ala-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 253:[D-Tyr1,Pro3,AzaGly7,Arg(Me)9]
MS10
D-Tyr-Asn-Pro-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 254:des(1)-[D-Tyr2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Phe-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 255:des(1)-[D-Tyr2,Nal(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-Nal(2)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 256:des(1)-[D-Pya(3)2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Pya(3)-Phe-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 257:[D-Tyr1,D-Asn2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Tyr-D-Asn-Phe-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 258:[D-Pya(3)1,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Pya(3)-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 259:[D-Ala1,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
D-Ala-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 260:des(1-3)-3-(3-Indolyl)propionyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
3-(3-Indolyl)propionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 261:[7Ψ8,CH₂NH]MS10
Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-GlyΨ(CH₂NH)Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 265:des(1-3)-Indole-3-carbonyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
Indole-3-carbonyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 266:des(1-3)-Indole-3-acetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
Indole-3-acetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

-continued

Compound No. 267:des(1-3)-4-(3-Indolyl)butyryl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 4-(3-Indolyl)butyryl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 268:des(1-3)-Diphenylacetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 Diphenylacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 269:des(1-3)-3-Phenylpropionyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 3-Phenylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 270:[D-Tyr1,Phe3,Ser-Phe5,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-Phe-Asn-Ser-Phe-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 271:des(1-2)-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 272:des(1-2)-Acetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 Acetyl-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 273:des(1-2)-Amidino-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 Amidino-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 274:des(1-2)-Acetyl-[Ala3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 Acetyl-Ala-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 275:des(1-2)-Acetyl-[Arg3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 Acetyl-Arg-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 276:des(1-2)-Acetyl-[Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 Acetyl-Thr-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 277:des(1-3)-n-Hexanoyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 n-Hexanoyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 278:des(1-3)-Cyclohexanecarbonyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 Cyclohexanecarbonyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 279:des(1-3)-2-(Indol-3-yl)ethylcarbamoyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 2-(indol-3-yl)ethylcarbamoyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 281:[D-Tyr1,Pya(2)6,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Pya(2)-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 282:[D-Tyr1,Pya(4)6,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Pya(4)-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 283:[D-Tyr1,D-Asn2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-D-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 284:[D-Tyr1,D-Asn2,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-D-Asn-Thr-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 285:[D-Tyr1,Pya(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-Pya(2)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 286:[D-Tyr1,Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

-continued

Compound No. 287:[D-Tyr1,D-Ser2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-D-Ser-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 288:[D-Tyr1,D-His2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-D-His-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 289:des(1)-[D-Pya(3)2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Pya(3)-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 290:[D-Pya(3)1,D-Asn2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Pya(3)-D-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 291:[D-Pya(3)1,D-Tyr2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Pya(3)-D-Tyr-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 293:[4Ψ5,CH₂NH]MS10 Tyr-Asn-Trp-AsnΨ(CH₂NH)Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 294:[1Ψ2,CH₂NH]MS10 TyrΨ(CH₂NH)Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 295:[2Ψ3,CH₂NH]MS10 Tyr-AsnΨ(CH₂NH)Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

Compound No. 296:[6Ψ7,CSNH,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheΨ(CSNH)Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 297:[D-Tyr1,Thr5,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Thr-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 298:[D-Tyr1,D-Asn2,Thr5,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-D-Asn-Trp-Asn-Thr-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 299:[1Ψ2,CH₂NH,AzaGly7,Arg(Me)9]-MS10 TyrΨ(CH₂NH)Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 300:[1Ψ2,CH₂NH,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]-MS10 TyrΨ(CH₂NH)Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 301:[D-Tyr1,Ala(2-Qui)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-Ala(2-Qui)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 302:[D-Tyr1,D-Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 303:[D-Tyr1,D-Asn2,Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-D-Asn-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 304:[D-Asn2,Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 Tyr-D-Asn-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 305:des(1)-[D-Tyr2,D-Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 306:[D-Pya(4)1,D-Asn2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 D-Pya(4)-D-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 307:[7Ψ8,CH₂NH,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-GlyΨ(CH₂NH)Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

-continued

Compound No. 308:[6Ψ7, CH₂NH, D-Tyr1, Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheΨ(CH₂NH)Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 310:[Nar9]MS10 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Nar-Phe-NH₂

Compound No. 311:[Nar(Me)9]MS10 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Nar(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 312:[Har(Me)9]MS10 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Har(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 313:[Dab9]MS10 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Dab-Phe-NH₂

Compound No. 314:[Orn9]MS10 Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Orn-Phe-NH₂

Compound No. 315:des(1)-[D-Asn2, Cha3, AzaGly7, Arg(Me)9]MS10 D-Asn-Cha-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 316:[D-Tyr1, D-Asn2, Thr3, AzaGly7, Arg(Me)9, Phe(4F)10]MS10 D-Tyr-D-Asn-Thr-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe(4F)-NH₂

Compound No. 317:[D-Tyr1, D-Asn2, Pya(4) 3, AzaGly7, Arg(Me)9, Phe(4F)10]MS10 D-Tyr-D-Asn-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe(4F)-NH₂

Compound No. 318:[D-Tyr1, AzaGly7, Arg(Me)9, Phe(4F)10]MS10 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe(4F)-NH₂

Compound No. 319:[6Ψ7, NHCO, D-Tyr1, Arg(Me)9]MS10 D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheΨ(NHCO)Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 322:des(1-3)-3-Pyridylpropionyl-[AzaGly7, Arg(Me)9]MS10 3-Pyridylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 323:des(1-3)-4-Imidazoleacetyl-[AzaGly7, Arg(Me)9]MS10 4-Imidazoleacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 324:des(1-3)-4-Piperidinecarbonyl-[AzaGly7, Arg(Me)9]MS10 Piperidinecarbonyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 325:des(1-3)-1-Piperidineacetyl-[AzaGly7, Arg(Me)9]MS10 Piperidineacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 326:des(1-3)-1-Methylpiperidino-1-acetyl-[AzaGly7, Arg(Me)9]MS10 Methylpiperidino-1-acetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 327:des(1-3)-1-Pyridinoacetyl-[AzaGly7, Arg(Me)9]MS10 1-Pyridinoacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 328:des(1-3)-D-Glucuronyl-[AzaGly7, Arg(Me)9]MS10 D-Glucuronyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 375:2-Aminoethyl-Gly-[D-Tyr1, Arg(Me)9]MS10 2-Aminoethyl-Gly-D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 385:des(1)-[D-Tyr2, D-Pya(4) 3, AzaGly7, Arg(Me)9, Trp10]MS10 D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂

-continued

Compound No. 386:des(1-3)-3-Pyridylpropionyl-[AzaGly7, Arg(Me)9, Trp10]MS103-Pyridylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂

Compound No. 387:Dap-[D-Tyr1, Arg(Me)9]MS10 Dap-D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 397:Methylthiocarbamoyl-Sar-[D-Tyr1, Arg(Me)9]MS10 Methylthiocarbamoyl-Sar-D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

Compound No. 400:(S)-1-(Quinolin-8-yl-carbamoyl)-4-thiapentylcarbamoyl-[D-Tyr1, Arg(Me)9]MS10 (S)-1-(Quinolin-8-yl-carbamoyl)-4-thiapentylcarbamoyl-D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂

[0323] However, the metastatin derivatives (1) of the present invention exclude the peptide consisting of the amino acid sequence of 1-54 (Compound No. 1), 2-54, 3-54, 4-54, 5-54, 6-54, 7-54, 8-54, 9-54, 10-54, 11-54, 12-54, 13-54, 14-54, 15-54, 16-54, 17-54, 18-54, 19-54, 20-54, 21-54, 22-54, 23-54, 24-54, 25-54, 26-54, 27-54, 28-54, 29-54, 30-54, 31-54, 32-54, 33-54, 34-54, 35-54, 36-54, 37-54, 38-54, 39-54, 40-54 (Compound No. 2), 41-54, 42-54 (Compound No. 32), 43-54, 44-54, 45-54 (Compound No. 3), 46-54 (Compound No. 4), 47-54, 48-54 or 49-54 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (native human metastatin or its partial peptides).

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0324] FIG. 1 shows evaluation of the chemotaxis inhibition activity of Compound Nos. 322, 305, 303, 286, 232 and 141 using hOT7T175-expressed CHO cells. On the abscissa, FBS- designates the absence of FBS, FBS+ designates the presence of FBS, 322 designates the addition of Compound No. 322, 305 designates the addition of Compound No. 305, 303 designates the addition of Compound No. 303, 286 designates the addition of Compound No. 286, 232 designates the addition of Compound No. 232, 141 designates the addition of Compound No. 141, (1-54) designates the addition of Metastatin (1-54), and (45-54) designates the addition of Metastatin 45-54. The ordinate denotes a relative activity when the chemotactic activity in the presence of FBS is made 100%.

[0325] FIG. 2 shows evaluation of the tumor growth inhibition activity of Compound No. 322 and Metastatin (1-54) using tumor-bearing mice with human colon cancer-derived cell line SW620, wherein the value indicates (mean)±(standard error). The symbols, open diamond, open circle, closed circle and closed square designate the results obtained when Vehicle (distilled water), Compound No. 322 (0.1 mM), Compound No. 322 (1 mM), and Metastatin (Metastatin 1-54) were added, respectively. The abscissa denotes the number of days after injection. The bar on the abscissa designates a dosing period. The ordinate denotes a tumor size (mm³).

[0326] FIG. 3 shows evaluation of the tumor growth inhibition activity of Compound No. 305 and Metastatin (1-54) using tumor-bearing mice with human colon tumor-derived cell line SW620, wherein the value indicates (mean)±(standard error). The symbols, open diamond, open circle, closed circle and closed square designate the results obtained when Vehicle (distilled water), Compound No. 305

(0.1 mM), Compound No. 305 (1 mM), and Metastin (Metastin 1-54) were added, respectively. The abscissa denotes the number of days after injection. The bar on the abscissa designates a dosing period. The ordinate denotes a tumor size (mm³).

[0327] FIG. 4 shows the results obtained by monitoring changes in blood glucose level when metastin was intravenously injected into rats under no anesthesia. In the figure, the symbols, open circle, closed triangle, closed circle and closed diamond designate the blood glucose level in the saline group, the group receiving 17 nmol/kg metastin, the group receiving 80 nmol/kg metastin and the group receiving 170 nmol/kg metastin, respectively. The value indicates (mean±SE) (n=5). The symbol * designates that the P-value is 0.05 or less, when compared to the saline group and the symbol ** designates that the P-value is 0.01 or less, when compared to the saline group.

[0328] FIG. 5 shows the results obtained by monitoring changes in the blood glucagon level when metastin was intravenously injected into rats under no anesthesia. In the figure, the symbols, open circle and closed circle designate the blood glucagon level in the saline group and the group receiving 80 nmol/kg metastin, respectively. The value indicates (mean±SE) (n=6-9). The symbol * designates that the P-value is 0.05 or less, when compared to the saline group and the symbol ** designates that the P-value is 0.01 or less, when compared to the saline group.

[0329] FIG. 6 shows the results obtained by monitoring changes in the blood insulin level when metastin was intravenously injected into rats under no anesthesia. In the figure, the symbols, open circle and closed circle designate the blood insulin level in the saline group and the group receiving 80 nmol/kg metastin, respectively. The value indicates (mean±SE) (n=6-9).

[0330] FIG. 7 shows the results obtained by monitoring changes in the blood corticosterone level when metastin was intravenously injected into rats under no anesthesia. In the figure, the symbols, open circle and closed circle designate the blood corticosterone level in the saline group and the group receiving 80 nmol/kg metastin, respectively. The value indicates (mean±SE) (n=4-5).

[0331] FIG. 8 shows the results obtained by monitoring changes in the thyroid hormone (T3) level in blood when metastin was intravenously injected into rats under no anesthesia. In the figure, the symbols, open circle and closed circle designate the thyroid hormone (T3) level in blood in the saline group and the group receiving 80 nmol/kg metastin, respectively. The value indicates (mean±SE) (n=4-5).

[0332] FIG. 9 shows the results obtained by monitoring changes in the blood glucose level when metastin was intravenously injected into rats under no anesthesia. In the figure, the symbols, open circle and closed circle designate the blood glucose level in the saline group and the group receiving 80 nmol/kg metastin, respectively. The value indicates (mean±SE) (n=6-9). The symbol * designates that the P-value is 0.05 or less, when compared to the saline group.

[0333] FIG. 10 shows the results obtained by monitoring changes in the blood glucose level when a metastin derivative was intravenously injected into rats under no anesthesia. In the figure, the symbols, open circle, closed circle and

closed triangle designate the blood glucose level in the saline group, the group receiving 80 nmol/kg KiSS1-305 and the group receiving 80 nmol/kg metastin, respectively. The value indicates (mean±SE) (n=5). The symbol * designates that the P-value is 0.05 or less, when compared to the saline group and the symbol ** designates that the P-value is 0.01 or less, when compared to the saline group.

[0334] FIG. 11 shows the results obtained by monitoring changes in the blood glucagon level when metastin was intravenously injected into rats under no anesthesia. In the figure, the symbols, open circle, closed circle and closed triangle designate the blood glucagon level in the saline group and the group receiving 80 nmol/kg KiSS1-305 (Compound No. 305), the group receiving 80 nmol/kg KiSS1-322 (Compound No. 322), respectively. The value indicates (mean±SE) (n=5). The symbol * designates that the P-value is 0.05 or less, when compared to the saline group.

[0335] FIG. 12 shows the level of estradiol contained in the rat plasma. In the figure, the ordinate and the abscissa denote the estradiol level and the dosing groups, respectively.

[0336] FIG. 13 shows the level of progesterone contained in the rat plasma. In the figure, the ordinate and the abscissa denote the estradiol level and the dosing groups, respectively.

[0337] FIG. 14 shows changes in the blood level of FSH in immature rat by metastin injection.

[0338] FIG. 15 shows changes in the blood level of LH in immature rat by metastin injection.

[0339] FIG. 16 shows changes in the blood level of progesterone in immature rat by metastin injection.

[0340] FIG. 17 shows changes in the blood level of FSH in rat by metastin injection.

[0341] FIG. 18 shows changes in the blood level of LH in rat by metastin injection.

[0342] FIG. 19 shows changes in the blood level of testosterone in rat by metastin injection.

[0343] FIG. 20 shows the number of oocytes per rat in each dosing group measured in TEST EXAMPLE 13. In the figure, the symbol, closed diamond designates the data for each rat and the symbol ? (solid bar) designates the mean value in each group.

[0344] FIG. 21 shows the blood levels of estradiol in the dosing groups measured in TEST EXAMPLE 13. In the figure, the symbol, closed triangle designates the data for each rat and the symbol ? (solid bar) designates the mean value in each group.

[0345] FIG. 22 shows the blood levels of progesterone in the dosing groups measured in TEST EXAMPLE 13. In the figure, the symbol, closed triangle designates the data for each rat and the symbol ? (solid bar) designates the mean value in each group.

Sequence Listing Free Text

[0346] SEQ; ID NO: 15 The C-terminal amino acid residue is amidated.

[0347] SEQ ID NO: 16 The C-terminal amino acid residue is amidated.

[0348] SEQ ID NO: 17 The C-terminal amino acid residue is amidated.

[0349] SEQ ID NO: 18 The C-terminal amino acid residue is amidated.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

[0350] The metastin derivatives (I) of the present invention can be prepared by publicly known methods for peptide synthesis. As the methods for peptide synthesis, for example, either solid phase synthesis or liquid phase synthesis may be used. That is, the partial peptide or amino acids that can constitute the peptide of the present invention are condensed with the remaining part to give the product having a desired sequence. Where the product has protecting groups, these protecting groups are removed to give the desired peptide. Publicly known methods for condensation and removal of the protecting groups are described in (1) to (5) below.

[0351] (1) M. Bodanszky & M. A. Ondetti: *Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, New York (1966)

[0352] (2) Schroeder & Luebke: *The Peptide*, Academic Press, New York (1965)

[0353] (3) Nobuo Izumiya, et al.: *Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken* (Basics and experiments of peptide synthesis), published by Maruzen Co. (1975)

[0354] (4) Haruaki Yajima & Shunpei Sakakibara: *Seikagaku Jikken Koza* (Biochemical Experiment) 1, *Tanpakushitsu no Kagaku* (Chemistry of Proteins) IV, 205 (1977)

[0355] (5) Haruaki Yajima, ed.: *Zoku Iyakuin no Kaihatsu* (A sequel to Development of Pharmaceuticals), Vol. 14, Peptide Synthesis, published by Hirokawa Shoten

[0356] After completion of the reaction, the product may be purified and isolated by a combination of conventional purification methods such as solvent extraction, distillation, column chromatography, liquid chromatography and recrystallization to give the peptide of the present invention. When the peptide obtained by the above methods is in a free form, the peptide can be converted into an appropriate salt by a publicly known method; when the protein is obtained in a salt form, it can be converted into its free form by publicly known methods.

[0357] For condensation of the protected amino acids or peptides, a variety of activation reagents for peptide synthesis may be used, but trisphosphonium salts, tetramethyluronium salts, carbodiimides, etc. are particularly preferred. Examples of trisphosphonium salts include benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), bromotris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate (PyBroP) and 7-azabenzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate (PyAOP), examples of tetramethyluronium salts include 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-hexafluorophosphate (HBTU), 2-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-hexafluorophosphate (HATU), 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU), 2-(5-norbornene-2,3-dicar-

boxyimido)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TNTU) and O-(N-succinimidyl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TSTU); examples of carbodiimides include DCC, N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) and N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDCI.HCl); etc. For condensation using these reagents, the addition of racemization inhibitors (e.g., HONB, HOBt, HOAt, HOObt, etc.) is preferred. Solvents used in condensation may be appropriately chosen from solvents that are known to be usable for condensation. For example, acid amides such as anhydrous or hydrous N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide, N-methylpyrrolidone, etc., halogenated hydrocarbons such as methylene chloride, chloroform, etc., alcohols such as trifluoroethanol, phenol, etc., sulfoxides such as dimethyl sulfoxide, etc., tertiary amines such as pyridine, etc., ethers such as dioxan, tetrahydrofuran, etc., nitriles such as acetonitrile, propionitrile, etc., esters such as methyl acetate, ethyl acetate, etc., or suitable mixtures thereof, etc. are used. The reaction temperature is appropriately chosen from the range known to be applicable to peptide binding reactions and is normally suitably chosen from the range of about -20° C. to 50° C. The activated amino acid derivatives are used generally in 1.5 to 6 times excess. In the case of solid phase synthesis, the condensation is examined using the ninhydrin reaction; when the condensation is insufficient, the condensation can be completed by repeating the condensation reaction without removal of the protecting groups. When the condensation is yet insufficient even after repeating the reaction, the unreacted amino acids are acylated with acetic anhydride or acetylimidazole to cancel any adverse effect on the subsequent reaction.

[0358] Examples of the protecting groups used to protect amino groups in the starting amino acids include Z, Boc, tert-pentyloxycarbonyl, isobornyloxycarbonyl, 4-methoxybenzyloxycarbonyl, Cl-Z, Br-Z, adamantyloxycarbonyl, trifluoroacetyl, phthaloyl, formyl, 2-nitrophenylsulphenyl, diphenylphosphinothiyl, Fmoc, etc. Examples of protecting groups for a carboxyl group include, in addition to the C₁₋₆ alkyl group, C₃₋₈ cycloalkyl group and C₇₋₁₄ aralkyl group for R described above, allyl, 2-adamantyl, 4-nitrobenzyl, 4-methoxybenzyl, 4-chlorobenzyl, phenacyl group, benzyloxycarbonylhydrazide, tert-butoxycarbonylhydrazide, tritylhydrazide, etc.

[0359] The hydroxyl group of serine and threonine can be protected, for example, by esterification or etherification. Examples of groups suitable for this esterification include a lower (C₂₋₄) alkanoyl group such as acetyl group, an aroyl group such as benzoyl group, etc. and a group derived from organic acid. Examples of a group suitable for the etherification include benzyl group, tetrahydropyranyl group, tert-butyl group, trytyl group (Trt), etc.

[0360] Examples of groups for protecting the phenolic hydroxyl group of tyrosine include Bzl, 2,6-dichlorobenzyl, 2-nitrobenzyl, Br-Z, tert-butyl, etc.

[0361] Examples of groups used to protect the imidazole moiety of histidine include Tos, 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl (Mtr), DNP, Bom, Bum, Boc, Trt, Fmoc, etc.

[0362] Examples of the protecting groups for a guanidino group of arginine include Tos, Z, 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl (Mtr), p-methoxybenzenesulfonyl

(MBS), 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc), mesitylene-2-sulfonyl (Mts), 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf), Boc, Z, NO₂, etc.

[0363] Examples of the protecting groups for side chain amino group of lysine include Z, Cl-Z, trifluoroacetyl, Boc, Fmoc, Trt, Mtr, 4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclo-hexylideneyl (Ddc), etc.

[0364] Examples of protecting groups for indolyl of tryptophan include formyl (For), Z, Boc, Mts, Mtr, etc.

[0365] The protecting groups for asparagine and glutamine include Trt, xanthyl (Xan), 4,4'-dimethoxybenzhydryl (Mbh), 2,4,6-trimethoxybenzyl (Tmob), etc.

[0366] Examples of the activated carboxyl groups in the starting material include the corresponding acid anhydrides, azides, activated esters [esters with alcohols (e.g., pentachlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4-dinitrophenol, cyanomethyl alcohol, p-nitrophenol, HONB, N-hydroxysuccinimide, 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) or 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt)], etc. As the amino acids in which the amino groups in the starting material are activated, the corresponding phosphorous amides are employed.

[0367] To eliminate (split off) the protecting groups, there are used catalytic reduction under hydrogen gas flow in the presence of a catalyst such as Pd-black or Pd-carbon; an acid treatment with anhydrous hydrogen fluoride, methanesulfonic acid, trifluoromethanesulfonic acid, trifluoroacetic acid, trimethylsilyl bromide (TMSBr), trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate, tetrafluoroboric acid, tris(trifluoroboron)boron, boron tribromide or a mixed solution thereof, a base treatment with diisopropylethylamine, triethylamine, piperidine, piperazine, etc., and reduction with sodium in liquid ammonia. The elimination of protecting groups by the acid treatment described above is carried out generally at a temperature of approximately -20° C. to 40° C. In the acid treatment, it is efficient to add a cation scavenger such as anisole, phenol, thioanisole, m-cresol, p-cresol, etc., dimethylsulfide, 1,4-butanedithiol, 1,2-ethanedithiol, etc. Furthermore, 2,4-dinitrophenyl group known as the protecting group for the imidazole of histidine is removed by a treatment with thiophenol. Formyl group used as the protecting group of the indole of tryptophan is removed by the aforesaid acid treatment in the presence of 1,2-ethanedithiol, 1,4-butanedithiol, etc. as well as by a treatment with an alkali such as a dilute sodium hydroxide solution, dilute ammonia, etc.

[0368] Protection of the functional groups that should not be involved in the reaction of the starting materials, protecting groups, removal of the protecting groups and activation of functional groups involved in the reaction may be appropriately chosen from publicly known groups and publicly known means.

[0369] In a method for obtaining the amides of the peptide, for example, the amidated form is synthesized on the solid phase using the resin for amidation, or the α -carboxyl group of the carboxy terminal amino acid is first protected by amidation; the peptide chain is then extended from the amino group side to a desired length. Thereafter, a peptide in which only the protecting group of the N-terminal α -amino group in the peptide chain has been removed and a peptide (or an amino acid) in which only the protecting group of the C-terminal carboxyl group has been eliminated

are prepared. The two peptides are condensed in a mixture of the solvents described above. The details of the condensation reaction are the same as described above. After the protected peptide obtained by the condensation is purified, all the protecting groups are removed by the method described above to give the desired crude polypeptide. This crude peptide is purified by various known purification means. Lyophilization of the major fraction gives the amide of the desired peptide.

[0370] When the metastin derivatives (I) of the present invention are present as a configurational isomer, a diastereomer, a conformer or the like, each can be isolated by the separating and purifying means described above, if desired. In addition, when the compound of the present invention is racemic, it can be separated into an S isomer and an R isomer by the conventional optical resolving means.

[0371] When the metastin derivatives (I) of the present invention have steric isomers, the present invention includes both of these isomers alone and the isomers present as a mixture thereof.

[0372] In addition, the metastin derivatives (I) of the present invention may be hydrated or non-hydrated.

[0373] The metastin derivatives (I) of the present invention may be labeled with an isotope (e.g., ³H, ¹⁴C, ³⁵S), etc.

[0374] Throughout the present specification, the peptides are represented in accordance with the conventional way of describing peptides, that is, the N-terminus (amino terminus) at the left hand and the C-terminus (carboxyl terminus) at the right hand. In the peptides, the C-terminus is usually in the form of an amide ($-\text{CONH}_2$), a carboxyl group ($-\text{COOH}$), a carboxylate ($-\text{COO}^-$), an alkylamide ($-\text{CONHR}$) or an ester ($-\text{COOR}$) and the amide ($-\text{CONH}_2$) is particularly preferred. Examples of the ester or alkylamide as R include a C₁₋₆ alkyl group such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, etc.; a C₃₋₈ cycloalkyl group such as cyclopentyl, cyclohexyl, etc.; a C₆₋₁₂ aryl group such as phenyl, a-naphthyl, etc.; a C₇₋₁₄ aralkyl group such as a phenyl-C_{1,2}-alkyl group, e.g., benzyl, phenethyl, etc., or an a-naphthyl-C_{1,2}-alkyl group such as a-naphthylmethyl, etc.; pivaloyloxymethyl group, which are widely used as an ester for oral use, and the like.

[0375] Examples of a salt of the metastin derivative (I) of the present invention include a metal salt, a salt with ammonium, a salt with an organic base, a salt with inorganic acid, a salt with organic acid, a salt with basic or acidic amino acid, and the like. Preferred examples of the metal salt include alkali metal salts such as sodium salts, potassium salts, etc.; alkaline earth metal salts such as calcium salts, magnesium salts, barium salts, etc.; aluminum salts; and the like. Preferred examples of the salts with organic bases include salts with trimethylamine, triethylamine, pyridine, picoline, 2,6-lutidine, ethanolamine, diethanolamine, triethanolamine, cyclohexylamine, dicyclohexylamine, N,N'-dibenzylethylenediamine, etc. Preferred examples of the salts with inorganic acids include salts with hydrochloric acid, hydrobromic acid, nitric acid, sulfuric acid, phosphoric acid, etc. Preferred examples of salts with organic acids include salts with formic acid, acetic acid, trifluoroacetic acid, phthalic acid, fumaric acid, oxalic acid, tartaric acid, maleic acid, citric acid, succinic acid, malic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid,

etc. Preferred examples of salts with basic amino acids include salts with arginine, lysine, ornithine, etc., and preferred examples of salts with acidic amino acids include salts with aspartic, glutamic acid, etc.

[0376] Among them, pharmaceutically acceptable salts are preferable. For example, when the compound has an acidic functional group, inorganic salts such as alkali metal salts (e.g., sodium salt, potassium salt, etc.), alkaline earth metal salts (e.g., calcium salt, magnesium salt, barium salt, etc.), ammonium salts, etc. are preferable. When the compound has a basic functional group, salts with inorganic acids with hydrochloric acid, hydrobromic acid, nitric acid, sulfuric acid, phosphoric acid, etc., and salts with organic acids such as acetic acid, phthalic acid, fumaric acid, oxalic acid, tartaric acid, maleic acid, citric acid, succinic acid, methanesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid, etc. are preferable.

[0377] A prodrug of the metastin derivative (I) or a salt thereof (hereinafter sometimes briefly referred to as the metastin derivative (I) of the present invention) means a metastin derivative that is converted into the metastin derivative (I) of the present invention under physiological conditions or with a reaction due to an enzyme, a gastric acid, etc., in the living body. That is, the prodrug of the present invention is a metastin derivative that undergoes enzymatic oxidation, reduction, hydrolysis, etc. to be converted into the metastin derivative (I) of the present invention, or a metastin derivative that undergoes hydrolysis, etc. by gastric acid, etc. to be converted into the metastin derivative (I) of the present invention.

[0378] Examples of the prodrugs of the metastin derivatives (I) of the present invention include metastin derivatives wherein an amino group of the metastin derivative (I) of the present invention is acylated, alkylated, phosphorylated, etc. (e.g., metastin derivatives wherein an amino group of the metastin derivative (I) of the present invention is eicosanoylated, alanylated, pentylaminocarbonylated, (5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methoxycarbonylated, tetrahydrofuranylated, pyrrolidylmethylated, pivaloyloxymethylated, tert-butylated, etc.); metastin derivatives wherein a hydroxy group of the metastin derivative (I) of the present invention is acylated, alkylated, phosphorylated, borated, etc. (e.g., metastin derivatives wherein an hydroxy group of the metastin derivative (I) of the present invention is acetylated, palmitoylated, propanoylated, pivaloylated, succinylated, fumarylated, alanylated, dimethylaminomethylcarbonylated, etc.); and metastin derivatives wherein a carboxyl group of the metastin derivative (I) of the present invention is esterified, amidated, etc. (e.g., metastin derivatives wherein a carboxyl group of the metastin derivative (I) of the present invention is ethyl-esterified, phenyl-esterified, carboxymethyl-esterified, dimethylaminomethyl-esterified, pivaloyloxymethyl-esterified, ethoxycarbonyloxyethyl-esterified, phthalidyl-esterified, (5-methyl-2-oxo-1,3-dioxolen-4-yl)methyl-esterified, cyclohexyloxycarbonyl-esterified, methylamidated, etc.); and the like. These metastin derivatives can be produced from the metastin derivative (I) of the present invention by per se publicly known methods.

[0379] The prodrugs of the metastin derivative (I) of the present invention may be those that are converted into the metastin derivative (I) of the present invention under the physiological conditions as described in "Pharmaceutical

Research and Development", Vol. 7 (Drug Design), pages 163-198, published 1990 by Hirokawa Publishing Co.

[0380] The metastin derivatives (I) of the present invention or their salts or prodrugs (hereinafter sometimes simply referred to as the compound of the present invention) possess a cancer metastasis suppressing activity or a cancer growth suppressing activity. Thus, the metastin derivatives are useful for pharmaceuticals such as agents for preventing or treating all cancers (e.g., lung cancer, gastric cancer, liver cancer, pancreatic cancer, colorectal cancer, rectal cancer, colonic cancer, prostate cancer, ovarian cancer, cervical cancer, breast cancer, etc.).

[0381] The compounds of the present invention also possess the effect of regulating a function of the pancreas and are thus useful as agents for treating/preventing various pancreatic diseases (e.g., acute or chronic pancreatitis, pancreatic cancer, etc.) as agents for regulating a function of the pancreas.

[0382] The compounds of the present invention also possess the effect of regulating a function of the placenta and are thus useful as pharmaceuticals for preventing or treating choriocarcinoma, hydatid mole, invasive mole, miscarriage, fetal hypoplasia, abnormal glucose metabolism, abnormal lipid metabolism or labor induction, as agents for regulating a function of the placenta.

[0383] Furthermore, since the compounds of the present invention possess the effects of increasing blood glucose level, promoting pancreatic glucagon secretion and promoting urine formation, the compounds are useful as pharmaceuticals such as hyperglycemic agents, pancreatic glucagon secretagogue agents or agents for promoting urine formation, which are useful for preventing or treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity.

[0384] In addition, the compounds of the present invention possess the effects of promoting gonadotropic hormone (e.g., FSH, LH, etc.) secretion, promoting sex hormone [e.g., androgens (e.g., testosterone, androstenedione, etc.), estrogens (e.g., estradiol, estrone, etc.), progesterones, etc.] secretion, improving gonadal function and inducing or stimulating ovulation, as well as a sexual maturation effect, etc. Therefore, the compounds can be used as agents for improving gonadal function, agents for inducing or stimulating ovulation, gonadotropic hormone secretagogue agents or sex hormone secretagogue agents, or agents for preventing/treating hormone-dependent cancers [e.g., prostate cancer, breast cancer, etc.], infertility [e.g., irregular menstruation, dysmenorrhea, amenorrhea, weight loss-induced amenorrhea, secondary amenorrhea, anovulation, hypoovarianism, hypogonadism, spermatogenic failure, hypogonadism (e.g., impotence, etc.), genital atrophy, testicular atrophy, testicular function disorders, azoospermia, hypoandrogenemia, etc.], endometriosis, myoma of the uterus, etc.

[0385] Furthermore, the metastin derivative of the present invention or salts thereof or their prodrugs are useful as agents for preventing/treating Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, etc.

[0386] Moreover, the compounds of the present invention have excellent blood stability, as compared to native metastatin such as metastatin 54 (1-54) or metastatin 10 (45-54).

[0387] The pharmaceutical compositions comprising the compounds of the present invention are low toxic and hence, the compounds of the present invention can be safely administered orally or parenterally (e.g., topically, rectally, intravenously, etc.) either directly as they are or in the form of pharmaceutical preparations such as tablets (including dragees and film-coated tablets), powdery dosage forms, granules, capsules (including soft capsules), liquid dosage forms, injections, suppositories, sustained release dosage forms, etc.

[0388] The compound of the present invention is contained in the pharmaceutical preparation of the present invention in about 0.01 to about 100 wt %, based on the total weight of the preparation.

[0389] A dose of the compound of the present invention may vary depending upon subject to be administered, target organ, conditions, route of administration, etc., and in oral administration, the compound is generally administered to the patient with cancer (as 60 kg body weight) in a daily dose of about 0.1 to about 100 mg, preferably about 1.0 to about 50 mg and more preferably about 1.0 to about 20 mg. In parenteral administration, a single dose of the compound may vary depending upon subject to be administered, target organ, conditions, route of administration, etc., and in the form of injectable preparation, it is advantageous to administer the compound intravenously to the patient with cancer (as 60 kg body weight) generally in a daily dose of about 0.01 to about 30 mg, preferably about 0.1 to about 20 mg, and more preferably about 0.1 to about 10 mg. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg weight can be administered.

[0390] Pharmacologically acceptable carriers, which may be used in manufacturing the pharmaceutical preparation of the present invention, include various organic or inorganic carrier substances conventionally used as materials for pharmaceutical preparations. These substances include, e.g., an excipient, a lubricant, a binder and a disintegrating agent in a solid dosage form, and a solvent, a dissolution aid, a suspending agent, an isotonicizing agent, a buffer, a soothing agent, etc. in a liquid dosage form. In addition, conventional additives such as a preservative, an antioxidant, a colorant, a sweetener, an adsorbent, a wetting agent, etc. can be appropriately used in suitable amounts, if necessary.

[0391] Examples of excipients include, e.g., lactose, saccharose, D-mannitol, starch, cornstarch, crystalline cellulose, light anhydrous silicic acid, etc.

[0392] Examples of lubricants include, e.g., magnesium stearate, calcium stearate, talc, colloidal silica, etc.

[0393] Examples of binders include, e.g., crystalline cellulose, saccharose, D-mannitol, dextrin, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, polyvinylpyrrolidone, starch, sucrose, gelatin, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, etc.

[0394] Examples of disintegrating agents include, e.g., starch, carboxymethylcellulose, carboxymethylcellulose calcium, sodium carboxymethyl starch, L-hydroxypropylcellulose, etc.

[0395] Examples of solvents include, e.g., water for injection, alcohol, propylene glycol, Macrogol, sesame oil, corn oil, olive oil, etc.

[0396] Examples of dissolution aids include, e.g., polyethylene glycol, propylene glycol, D-mannitol, benzyl benzoate, ethanol, trisaminomethane, cholesterol, triethanolamine, sodium carbonate, sodium citrate, etc.

[0397] Examples of suspending agents include, e.g., surfactants such as stearyltriethanolamine, sodium laurylsulfate, lauryl aminopropionate, lecithin, benzalkonium chloride, benzethonium chloride, glycerine monostearate, etc.; hydrophilic polymers such as polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxymethylcellulose, hydroxyethylcellulose, hydroxypropylcellulose, etc.

[0398] Examples of isotonicizing agents include, e.g., glucose, D-sorbitol, sodium chloride, glycerine, D-mannitol, etc.

[0399] Examples of buffers include, e.g., buffering solutions of a phosphate, acetate, carbonate, citrate, etc.

[0400] Examples of soothing agents include, e.g., benzyl alcohol, etc.

[0401] Examples of preservatives include, e.g., p-hydroxybenzoates, chlorobutanol, benzyl alcohol, phenethyl alcohol, dehydroacetic acid, sorbic acid, etc.

[0402] Examples of antioxidants include, e.g., a sulfite, ascorbic acid, α -tocopherol, etc.

[0403] Furthermore, the compound of the present invention can be used in combination with drugs other than the compound of the present invention.

[0404] Examples of the drugs, which can be used in combination with the compound of the present invention include agents for treating cancer such as chemotherapeutic agents, hormone therapeutic agents, immunotherapeutic agents, etc. (hereinafter referred to as a concomitant drug).

[0405] Examples of "chemotherapeutic agents" include, e.g., alkylating agents, antimetabolites, anticancer antibiotics, plant-derived anticancer agents, etc.

[0406] Examples of "alkylating agents" include, e.g., nitrogen mustard, nitrogen mustard-N-oxide hydrochloride, chlorambutyl, cyclophosphamide, ifosfamide, thiotepa, carboquone, improsulfan tosylate, busulfan, nimustine hydrochloride, mitobronitol, rnelphalan, dacarbazine, ranimustine, estramustine sodium phosphate, triethylenemelamine, carmustine, lomustine, streptozocin, pipobroman, etoglucid, carboplatin, cisplatin, miboplatin, nedaplatin, oxaliplatin, altretamine, ambamustine, dibrospidium hydrochloride, fotemustine, prednimustine, pumitepa, ribomustin, temozolomide, treosulphan, trophosphamide, zinostatin stimalamer, carboquone, adozelesin, cystemustine, bizelesin, etc.

[0407] Examples of "antimetabolites" include, e.g., mercaptopurine, 6-mercaptopurine riboside, thioinosine, methotrexate, enocitabine, cytarabine, cytarabine ocfosfate, ancitabine hydrochloride, 5-FU drugs (e.g., fluorouracil, tegafur, UFT, doxifluridine, carmofur, galloctabine, emmifetur, etc.), aminopterin, leucovorin calcium, tabloid, butocine, folinate calcium, levofolinate calcium, cladribine,

emitefur, fludarabine, gemcitabine, hydroxycarbamide, pentostatin, piritrexim, idoxuridine, mitoguzone, thiazophrine, ambamustine, etc.

[0408] Examples of "anticancer antibiotics" include, e.g., actinomycin D, actinomycin C, mitomycin C, chromomycin A3, bleomycin hydrochloride, bleomycin sulfate, peplomycin sulfate, daunorubicin hydrochloride, doxorubicin hydrochloride, aclarubicin hydrochloride, pirarubicin hydrochloride, epirubicin hydrochloride, neocarzinostatin, mithramycin, sarcomycin, carzinophilin, mitotane, zorubicin hydrochloride, mitoxantrone hydrochloride, idarubicin hydrochloride, etc.

[0409] Examples of "plant-derived anticancer agents" include, e.g., etoposide, etoposide phosphate, vinblastine sulfate, vincristine sulfate, vindesine sulfate, teniposide, paclitaxel, docetaxel, vinorelbine, etc.

[0410] Examples of "hormone therapeutic agents" include, e.g., fosfestrol, diethylstilbestrol, chlorotrianisene, medroxyprogesterone acetate, megestrol acetate, chlormadinone acetate, cyproterone acetate, danazol, allylestrenol, gestrinone, meparticin, raloxifene, ormeloxifene, levormeloxifene, anti-estrogens (e.g., tamoxifen citrate, toremifene citrate, etc.), pill dosage forms, mepitiostane, testrolactone, aminoglutethimide, LH-RH agonists (e.g., goserelin acetate, buserelin, Leuporelin, etc.), droloxifene, epitioestanol, ethinylestradiol sulfonate, aromatase inhibitors (e.g., fadrozole hydrochloride, anastrozole, retrozole, exemestane, vorozole, formestane, etc.), anti-androgens (e.g., flutamide, bicalutamide, nilutamide, etc.), 5 α -reductase inhibitors (e.g., finasteride, epristeride, etc.), adrenocorticohormone drugs (e.g., dexamethasone, prednisolone, betamethasone, triamcinolone, etc.), androgen synthesis inhibitors (e.g., abiraterone, etc.), retinoid and drugs that retard retinoid metabolism (e.g., liarozole, etc.), and among them, LH-RH agonists (e.g., goserelin acetate, buserelin, Leuporelin, etc.) are preferable.

[0411] Examples of "immunotherapeutic agents (BRM)" include, e.g., picibanil, kresfin, sizofiran, lentinan, ubenimex, interferons, interleukins, macrophage colony-stimulating factor, granulocyte colony-stimulating factor, erythropoietin, lymphotoxin, BCG vaccine, *Corynebacterium parvum*, levamisole, polysaccharide K, procodazole, etc.

[0412] The combined use of the compound of the present invention and a concomitant drug results in, for example, the following excellent effects.

[0413] (1) The dose of the compound of the present invention can be reduced when compared with the dose when administered alone.

[0414] (2) A concomitant drug with the compound of the present invention can be chosen depending on the condition (mild, severe, etc.) of a patient.

[0415] (3) A concomitant drug, whose functional mechanism is different from that of the compound of the present invention, can be chosen so that a treatment period can be set longer.

[0416] (4) A concomitant drug, whose functional mechanism is different from that of the compound of the present invention, can be chosen so that sustained therapeutic effects can be achieved.

[0417] (5) A synergistic effect can be obtained by the combined use of the compound of the present invention and a concomitant drug.

[0418] Hereinafter, the combined use of the compound (1) of the present invention and a concomitant drug is referred to as "the combined preparation of the present invention."

[0419] When the combined preparation of the present invention is used, a dosing period of the compound of the present invention and the combination is not restricted; the compound of the present invention or its pharmaceutical composition and a concomitant drug or its pharmaceutical composition may be administered to the subject to be administered either simultaneously or at certain time intervals. The dose of a concomitant drug may be modified according to the dose used clinically and may be appropriately chosen depending upon subject to be administered, route for administration, disease, combination, etc.

[0420] A mode for administration of the combined preparation of the present invention is not particularly limited, but it is sufficient that the compound of the present invention is used in combination with a concomitant drug at the time of administration. For such mode of administration, there are, for example, (1) administration of a bolus dosage form obtained by mixing the compound of the present invention and a concomitant drug together at the same time, (2) simultaneous administration of two dosage forms prepared separately from the compound of the present invention and a concomitant drug through the same route for administration, (3) administration of two dosage forms prepared separately from the compound of the present invention and a concomitant drug at certain time intervals through the same route for administration, (4) simultaneous administration of two dosage forms prepared separately from the compound of the present invention and a concomitant drug through different routes for administration, (5) administration of two dosage forms prepared separately from the compound of the present invention and a concomitant drug at certain time intervals (e.g., administration of the compound of the present invention and a concomitant drug in this order, or administration in a reversed order) through different routes for administration, etc.

[0421] The combined preparation of the present invention is low toxic and can be safely administered orally or parenterally (e.g., topically, rectally, intravascularly, etc.) either directly as they are or in the form of pharmaceutical preparations such as tablets (including dragees and film-coated tablets), powdery dosage forms, granules, capsules (including soft capsules), liquid dosage forms, injections, suppositories, sustained release dosage forms, etc., which are obtained by mixing the compound of the present invention or (and) a concomitant drug described above with pharmacologically acceptable carriers. Injectable dosage forms can be administered intravenously, intramuscularly or subcutaneously, into the organ, or directly at the focus.

[0422] Pharmacologically acceptable carriers, which may be used to manufacture the combined preparation of the present invention, include various organic or inorganic carrier substances conventionally used as materials for pharmaceutical preparations. These substances include, e.g., an excipient, a lubricant, a binder and a disintegrating agent in a solid dosage form, and a solvent, a dissolution aid, a suspending agent, an isotonicizing agent, a buffer, a soothing

agent, etc. in a liquid dosage form. In addition, conventional additives such as a preservative, an antioxidant, a colorant, a sweetener, an adsorbent, a wetting agent, etc. can be appropriately used in suitable amounts, if necessary.

[0423] Examples of excipients include, e.g., lactose, saccharose, D-mannitol, starch, cornstarch, crystalline cellulose, light anhydrous silicic acid, etc.

[0424] Examples of useful lubricants include, e.g., magnesium stearate, calcium stearate, talc, colloidal silica, etc.

[0425] Examples of binders include, e.g., crystalline cellulose, saccharose, D-mannitol, dextrin, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, polyvinylpyrrolidone, starch, sucrose, gelatin, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, etc.

[0426] Examples of disintegrating agents include, e.g., starch, carboxymethylcellulose, carboxymethylcellulose calcium, sodium carboxymethyl starch, L-hydroxypropylcellulose, etc.

[0427] Examples of solvents include, e.g., water for injection, alcohol, propylene glycol, Macrogol, sesame oil, corn oil, olive oil, etc.

[0428] Examples of dissolution aids include, e.g., polyethylene glycol, propylene glycol, D-mannitol, benzyl benzoate, ethanol, trisaminomethane, cholesterol, triethanolamine, sodium carbonate, sodium citrate, etc.

[0429] Examples of suspending agents include, e.g., surfactants such as stearyltriethanolamine, sodium laurylsulfate, lauryl aminopropionate, lecithin, benzalkonium chloride, benzethonium chloride, glycerine monostearate, etc.; hydrophilic polymers such as polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxymethylcellulose, hydroxyethylcellulose, hydroxypropylcellulose, etc.

[0430] Examples of isotonicizing agents include, e.g., glucose, D-sorbitol, sodium chloride, glycerine, D-mannitol, etc.

[0431] Examples of buffers include, e.g., buffering solutions of a phosphate, acetate, carbonate, citrate, etc.

[0432] Examples of soothing agents include, e.g., benzyl alcohol, etc.

[0433] Examples of preservatives include, e.g., p-hydroxybenzoates, chlorobutanol, benzyl alcohol, phenethyl alcohol, dehydroacetic acid, sorbic acid, etc.

[0434] Examples of antioxidants include, e.g., a sulfite, ascorbic acid, α -tocopherol, etc.

[0435] In the combined preparation of the present invention, a ratio of the compound of the present invention to a concomitant drug may be appropriately chosen depending upon subject to be administered, route for administration, disease, combination, etc.

[0436] For example, the amount of the compound of the present invention contained in the combined preparation of the present invention varies depending on the dosage form of the preparation, but is usually about 0.01 to 100% by weight, preferably about 0.1 to 50% by weight, and more preferably about 0.5 to 20% by weight, based on the total weight of the preparation.

[0437] The amount of a concomitant drug contained in the combined preparation of the present invention varies depending on the dosage form of the preparation, but is usually about 0.01 to 100% by weight, preferably about 0.1 to 50% by weight, and more preferably about 0.5 to 20% by weight, based on the total weight of the preparation.

[0438] The amount of additives such as a carrier, etc. contained in the combined preparation of the present invention varies depending on the dosage form of the preparation, and is usually about 1 to 99.99% by weight, preferably about 10 to 90% by weight, based on the total weight of the preparation.

[0439] These amounts may be the same, also when the compound of the present invention and a concomitant drug are separately prepared, respectively.

[0440] These preparations can be manufactured by methods per se publicly known generally used conventionally.

[0441] For example, an injectable dosage form can be prepared by dissolving, suspending or emulsifying the compound of the present invention or a concomitant drug in a dispersing agent (e.g., Tween 80 (manufactured by Atlas Powder Company, USA), HCO 60 (manufactured by Nikko Chemicals Co., Ltd.), polyethylene glycol, carboxymethyl cellulose, sodium alginate, etc.), a stabilizer (e.g., ascorbic acid, sodium pyrosulfite), a surfactant (e.g., polysorbate 80, macrogol, etc.), a solubilizing agent (e.g., glycerin, ethanol, etc.), a buffering agent (e.g., phosphoric acid or its alkali metal salt, citric acid or its alkali metal salt, etc.), an isotonicizing agent (e.g., sodium chloride, potassium chloride, mannitol, sorbitol, glucose, etc.), a pH adjusting agent (e.g., hydrochloric acid, sodium hydroxide, etc.), a preservative (e.g., ethyl p-oxybenzoate, benzoic acid, methylparabene, propylparabene, benzyl alcohol, etc.), a solubilizer (e.g., concentrated glycerin, meglumine, etc.), a dissolution aid (e.g., propylene glycol, sucrose, etc.), a soothing agent (e.g., glucose, benzyl alcohol, etc.), a vegetable oil such as olive oil, sesame oil, cottonseed oil, corn oil, etc., a dissolution aid such as propylene glycol or the like to prepare into an oily injection.

[0442] An oral dosage form can be produced in a conventional manner by adding to the compound of the present invention or a concomitant drug, for example, an excipient (e.g., lactose, sucrose, starch, etc.), a disintegrating agent (e.g., starch, calcium carbonate, etc.), a binder (e.g., starch, gum arabic, carboxymethyl cellulose, polyvinylpyrrolidone, hydroxypropyl cellulose, etc.), a lubricant (e.g., talc, magnesium stearate, polyethylene glycol 6000, etc.) and other additives, compressing the resulting mixture and, if necessary, coating the compressed product for the purpose of taste masking, enteric degradation or sustained release by techniques per se publicly known. Coating agents for this purpose include, for example, hydroxypropylmethyl cellulose, ethyl cellulose, hydroxymethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, polyoxyethylene glycol, Tween 80, Prulonic F68, cellulose acetate phthalate, hydroxypropylmethyl cellulose phthalate, hydroxymethyl cellulose acetate succinate, Eudragit (manufactured by Rohm Company, Germany, methacrylic acid/acrylic acid copolymer) and dyes (e.g., iron oxide, titanium dioxide). The oral dosage form may be either a rapid release dosage form or a sustained release dosage form.

[0443] For example, in a suppository, the compound of the present invention or a concomitant drug is prepared into an

oily or aqueous solid, semi-solid or liquid composition by techniques per se publicly known. Oily bases used for the composition described above include glycerides of higher fatty acids [e.g., cacao butter, uilepsols (manufactured by Dynamite Nobel Company, Germany), etc.], moderate fatty acids [e.g., miglyols (manufactured by Dynamite Nobel Company, Germany), etc.], vegetable oils (e.g., sesame oil, soybean oil, cottonseed oil, etc.), and the like. Aqueous bases include, for example, polyethylene glycols and propylene glycol. Bases for aqueous gels include, for example, natural rubbers, cellulose derivatives, vinyl polymers, acrylic polymers, etc.

[0444] Examples of the sustained release dosage form above include sustained release microcapsules, and the like.

[0445] Sustained release microcapsules can be obtained by per se publicly known methods, and are preferably prepared in the form of, e.g., a sustained release dosage form by the method [2] shown below and administered.

[0446] Preferably, the compound of the present invention is prepared into a dosage form for oral administration such as a solid dosage form (e.g., powdery dosage form, granules, tablets, capsules) or into a dosage form for rectal administration such as a suppository, etc. A dosage form for oral administration is particularly preferred.

[0447] A concomitant drug can be prepared into the dosage form described above, depending on the kind of drug.

[0448] Hereinafter, [1] an injectable preparation of the compound of the present invention or a concomitant drug and its production, [2] a sustained release or immediate release preparation of the compound of the present invention or a concomitant drug and its production and [3] a sublingual, buccal or rapid oral disintegrating preparations of the compound of the present invention or a concomitant drug and its production will be specifically described.

[1] Injectable Preparation and its Production

[0449] An injectable preparation obtained by dissolving the compound of the present invention or a concomitant drug in water is preferred. The injectable preparation may contain a benzoate and/or a salicylate.

[0450] The injectable preparation is obtained by dissolving the compound of the present invention or a concomitant drug and optionally a benzoate and/or a salicylate in water.

[0451] Examples of the benzoate and/or salicylate described above include an alkali metal salt such as sodium and potassium salts, etc., an alkaline earth metal salt such as calcium and magnesium salts, etc., an ammonium salt, a meglumine salt, a salt of an organic acid such as trometamol, and the like.

[0452] The concentration of the compound of the present invention or a concomitant drug in the injectable preparation is about 0.5 to 50 w/v %, preferably about 3 to 20 w/v %. The concentration of the benzoate and/or salicylate is 0.5 to 50 w/v %, preferably 3 to 20 w/v %.

[0453] Furthermore, additives generally used in an injectable preparation such as a stabilizer (ascorbic acid, sodium pyrosulfite, etc.), a surfactant (polysorbate 80, macrogol, etc.), a solubilizing agent (glycerin, ethanol, etc.), a buffering agent (phosphoric acid and its alkali metal salt, citric acid and its alkali metal salt, etc.), an isotonicizing agent

(sodium chloride, potassium chloride, etc.), a dispersing agent (hydroxypropylmethyl cellulose, dextrin), a pH adjusting agent (hydrochloric acid, sodium hydroxide, etc.), a preservative (ethyl p-oxybenzoate, benzoic acid, etc.), a solubilizer (concentrated glycerin, meglumine, etc.), a dissolution aid (propylene glycol, saccharose, etc.), a soothing agent (glucose, benzyl alcohol, etc.) are appropriately added to the preparation. Any of these additives is added in an amount generally used in an injectable preparation.

[0454] The injectable preparation is adjusted to pH of 2 to 12, preferably 2.5 to 8.0 by adding a pH adjusting agent.

[0455] The injectable preparation is obtained by dissolving both the compound of the present invention or a concomitant drug and optionally a benzoate and/or salicylate, and, if necessary, the above additives in water. These components may be dissolved in any order according to the same manner as in a conventional injectable preparation.

[0456] An aqueous solution for injection is preferably warmed, and used as an injectable preparation after filtration sterilization by filtration or autoclaved as in a conventional injectable preparation to provide for an injectable preparation.

[0457] An aqueous injectable preparation is preferably autoclaved, e.g., at 100 to 121° C. for 5 to 30 minutes.

[0458] Moreover, the preparation may be in a solution form to which antibacterial activity is imparted to be usable as a multiple dosage form in divided dosing.

[2] Sustained Release or Immediate Release Preparation and its Production

[0459] A preferred sustained release preparation comprises a core comprising the compound of the present invention or a concomitant drug, which is optionally coated with a water-insoluble material or a swelling polymer. For example, a sustained release preparation for oral administration of a once-daily dosage form is preferred.

[0460] Examples of the water-insoluble material used for the coating agent include cellulose ethers such as ethyl cellulose, butyl cellulose, etc., cellulose esters such as cellulose acetate, cellulose propionate, etc., polyvinyl esters such as polyvinyl acetate, polyvinyl butyrate, etc., acrylic acid polymers such as an acrylic acid/methacrylic acid copolymer, a methyl methacrylate copolymer, an ethoxyethyl methacrylate/cinnamoethyl methacrylate/aminoalkyl methacrylate copolymer, a polyacrylic acid, a polymethacrylic acid, a methacrylic acid alkylamide copolymer, a poly(methyl methacrylate), a polymethacrylate, an aminoalkyl methacrylate copolymer, a poly(methacrylic anhydride), a glycidyl methacrylate copolymer, in particular, a series of Eudragits (Rohm & Pharma) such as Eudragit RS-100, RL-100, RS-30D, RL-30D, RL-PO, RS-PO (ethyl acrylate/methyl methacrylate/chlorotrimethyl methacrylate/ethyl ammonium copolymer) and Eudragit NE-30D (methyl methacrylate/ethyl acrylate copolymer), etc., hydrogenated oils such as hydrogenated castor oil (e.g., LUBRI WAX (Freund Industrial Co., Ltd.), etc.), waxes such as carnauba wax, a fatty acid glycerin ester, paraffin, etc., polyglycerin fatty acid esters, etc.

[0461] The swelling polymer is preferably a polymer having an acidic dissociated radical and exhibiting pH-dependent swelling, and a polymer having an acidic disso-

ciated radical, which undergoes a less swelling at an acidic pH such as in the stomach but is swollen extensively at a neutral pH region such as in the small and large intestines, is preferred.

[0462] Examples of such a polymer having an acidic dissociated radical and exhibiting pH-dependent swelling include a crosslinked polyacrylic acid polymer such as Carbomers 934P, 940, 941, 974P, 980, 1342, etc., polycarbophil and calcium polycarbophil (all manufactured by BF Goodrich Chemicals), Hivis Wakos 103, 104, 105 and 304 (all manufactured by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), etc.

[0463] The coating agent used in the sustained release preparation may further contain a hydrophilic material.

[0464] Examples of the hydrophilic material include a polysaccharide which may have a sulfate group, such as pullulan, dextrin, alkali metal alginates, etc., a polysaccharide having a hydroxyalkyl group or a carboxyalkyl group such as hydroxypropyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, sodium carboxymethylcellulose, etc., methyl cellulose, polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohol, polyethylene glycol, etc.

[0465] The amount of the water-insoluble material contained in the coating agent of the sustained release preparation is about 30 to about 90% (w/w), preferably about 35 to about 80% (w/w), more preferably about 40 to about 75% (w/w), and the swelling polymer content is about 3 to about 30% (w/w), preferably about 3 to about 15% (w/w). The coating agent may further contain a hydrophilic material, and the amount of the hydrophilic material contained in the coating agent is about 50% (w/w) or less, preferably about 5 to about 40% (w/w), more preferably about 5 to about 35% (w/w). As used herein, the % (w/w) above is used to mean a % by weight based on the coating agent composition, which is the remainder of the coating agent solution after removing any solvent (e.g., water, a lower alcohol such as methanol, ethanol, etc.).

[0466] The sustained release preparation is manufactured by preparing a core containing a drug as illustrated below, followed by coating the resulting core with a coating agent solution obtained by heat-melting a water-insoluble material or a swelling polymer or by dissolving or dispersing such a material in a solvent.

I. Preparation of Drug-Containing Core

[0467] The shape of a core containing a drug to be coated with a coating agent (hereinafter sometimes simply referred to as a core) is not specifically limited but preferably prepared into a particulate shape such as granules, fine granules, or the like.

[0468] When the core is granules or fine granules, they have a mean particle size of preferably about 150 to about 2,000 μm , more preferably about 500 to about 1,400 μm .

[0469] The core can be prepared in a conventional manner. For example, a drug is mixed with a suitable excipient, binder, disintegrating agent, lubricant, stabilizer, etc., and then subjected to wet extrusion granulation, fluidized bed granulation, or the like.

[0470] The drug content in the core is about 0.5 to about 95% (w/w), preferably about 5.0 to about 80% (w/w), more preferably about 30 to about 70% (w/w).

[0471] Examples of the excipient contained in the core include a saccharide such as saccharose, lactose, mannitol, glucose, etc., starch, crystalline cellulose, calcium phosphate, cornstarch, etc. Among others, crystalline cellulose and cornstarch are preferred.

[0472] Examples of the binder used include polyvinyl alcohol, hydroxypropyl cellulose, polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, Pluronic F68, gum arabic, gelatin, starch, etc. Examples of the disintegrating agent include calcium carboxymethyl cellulose (ECG505), sodium croscarmellose (Ac-Di-Sol), crosslinked polyvinylpyrrolidone (crospovidone), low substituted hydroxypropyl cellulose (L-HPC), etc. Among them, hydroxypropyl cellulose, polyvinylpyrrolidone and low substituted hydroxypropyl cellulose are preferred. Examples of the lubricant and the anticoagulant include talc, magnesium stearate and its inorganic salts, and examples of the lubricant include polyethylene glycol, etc. Examples of the stabilizer include an acid such as tartaric acid, citric acid, succinic acid, fumaric acid, maleic acid, etc.

[0473] In addition to the technique described above, the core can be prepared by using other techniques such as a tumbling granulation technique, a pan coating technique, a fluidized bed coating technique and a melt granulation technique, wherein a drug or a mixture of the drug with an excipient, a lubricant, etc. is portionwise added to inert carrier particles as seeds for the core with spraying a binder dissolved in a suitable solvent such as water, a lower alcohol (e.g., methanol, ethanol, etc.) or the like. Examples of the inert carrier particles include those prepared from sucrose, lactose, starch, crystalline cellulose and waxes, and, preferably, these carriers have a mean particle size of about 100 μm to about 1,500 μm .

[0474] In order to separate the drug contained in the core from a coating agent, the surface of the core may be covered with a protective material. Examples of the protective material include the hydrophilic material described above and water-insoluble material. The preferred protective material is polyethylene glycol or a polysaccharide having a hydroxyalkyl group or a carboxyalkyl group, more preferably, hydroxypropylmethyl cellulose and hydroxypropyl cellulose. The protective material may contain, as a stabilizer, an acid such as tartaric acid, citric acid, succinic acid, fumaric acid, maleic acid, etc., and a lubricant such as talc. When the protective material is used, the amount thereof to be coated is about 1 to about 15% (w/w), preferably about 1 to about 10% (w/w), more preferably about 2 to about 8% (w/w) based on the core.

[0475] The protective material can be coated by a conventional coating method and specifically, the core is spray-coated with the protective material by a fluidized bed coating technique, a pan coating technique, etc.

II. Coating of Core with Coating Agent

[0476] The core obtained in I above is coated with a coating agent solution prepared by melt-heating the water-insoluble material and pH-dependent swelling polymer described above and a hydrophilic material or by dissolving or dispersing them in a solvent to obtain a sustained release preparation.

[0477] As a coating method of the core with the coating agent solution, there are, for example, spray-coating, etc.

[0478] The composition ratio of the water-insoluble material, swelling polymer and hydrophilic material in the coating agent solution can be appropriately chosen to be within the amounts of the respective components contained in the coating.

[0479] The amount of the coating agent is about 1 to about 90% (w/w), preferably about 5 to about 50% (w/w), more preferably about 5 to about 35% (w/w) based on the core (excluding the protective material coating).

[0480] As the solvent for the coating agent solution, water and an organic solvent can be used alone or as a mixture thereof. When a mixture is used, the ratio of water and the organic solvent (water/organic solvent: a weight ratio) may vary with the range of 1 to 100%, and is preferably 1 to about 30%. The organic solvent is not particularly limited so far as it can dissolve the water-insoluble material, and examples of the solvent include a lower alcohol such as methyl alcohol, ethyl alcohol, isopropyl alcohol, n-butyl alcohol, etc., a lower alkanone such as acetone, acetonitrile, chloroform, methylene chloride, etc. Among them, a lower alcohol is preferred, with ethyl alcohol and isopropyl alcohol being more preferred. Water and a mixture of water and an organic solvent are used preferably as solvents for the coating agent solution. In this case, an acid such as tartaric acid, citric acid, succinic acid, fumaric acid, maleic acid, etc. may be added to the coating agent solution, if necessary, for the purpose of stabilizing the coating agent solution.

[0481] Where the coating is performed by spray coating, the coating can be carried out using a conventional coating technique. Specifically, the core is sprayed with a coating agent solution by a fluidized bed coating technique, a pan coating technique, or the like. At this time, a lubricant such as talc, titanium oxide, magnesium stearate, calcium stearate, light silicic anhydride, etc., and a plasticizer such as glycerin fatty ester, hardened castor oil, triethyl citrate, cetyl alcohol, stearyl alcohol, etc. may also be added.

[0482] After coating with a coating agent, an antistatic agent such as talc may also be admixed, if necessary.

[0483] The immediate release preparation may be a liquid (solution, suspension, emulsion, etc.) or a solid (particles, pills, tablets, etc.). An oral preparation and a parenteral preparation such as an injectable preparation may be used, and an oral preparation is preferred.

[0484] The immediate release preparation may usually contain a carrier, additives and an excipient (hereinafter sometimes abbreviated as excipients) which are conventionally used in the pharmaceutical field, in addition to a drug which is an active ingredient. The pharmaceutical excipients are not specifically limited so long as they are excipients conventionally used in the pharmaceutical field. Examples of the excipient for an oral solid preparation include lactose, starch, cornstarch, crystalline cellulose (Avicel PH101, manufactured by Asahi Kasei Corporation, etc.), powdered sugar, granulated sugar, mannitol, light silicic anhydride, magnesium carbonate, calcium carbonate, L-cysteine, etc., with cornstarch and mannitol being preferred. Any of these excipients may be employed alone or in combination with each other. The amounts of the excipients are, for example, about 4.5 to about 99.4 w/w %, preferably about 20 to about 98.5 w/w %, more preferably about 30 to about 97 w/w %, based on the total weight of the immediate release preparation.

[0485] The amount of the drug contained in the immediate release preparation is appropriately chosen from the range of about 0.5 to about 95%, preferably about 1 to about 60%, based on the total amount of the immediate release preparation.

[0486] When the immediate release preparation is an oral solid preparation, the preparation contains a disintegrating agent in addition to the components described above. Examples of the disintegrating agent include calcium carboxymethylcellulose (ECG-505 manufactured by GOTOKU CHEMICAL Co., Ltd.), sodium croscarmellose (for example, Ac-Di-Sol manufactured by Asahi Kasei Corporation), crospovidone (for example, COLIDON CL manufactured by BASF), low-substituted hydroxypropyl cellulose (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.), carboxymethyl starch (MATSUTANI CHEMICAL INDUSTRY Co., Ltd.), sodium carboxymethyl starch (EXORITAB manufactured by KIMURA SANGYO), partial α starch (PCS manufactured by Asahi Kasei Corporation), etc. For example, the disintegrating agent that disintegrates granules by water absorption or swelling upon contact with water, or forming a channel between the active component comprising the core and an excipient can be used. Any of these disintegrating agents can be used alone or in combination with each other. The amount of the disintegrating agent used may be appropriately chosen depending upon the type and the amount of the drug used or a particular preparation design for the intended release performance. For example, the amount is about 0.05 to about 30 w/w %, preferably about 0.5 to about 15 w/w % based on the total weight of the immediate release preparation.

[0487] When the immediate release preparation is an oral solid preparation, the preparation may optionally contain additives conventionally used in a solid preparation, in addition to the components described above. Examples of the additives include binders (for example, sucrose, gelatin, powdery gum arabic, methyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, carboxymethylcellulose, polyvinylpyrrolidone, pullran, dextrin, etc.), lubricants (polyethylene glycol, magnesium stearate, talc, light silicic anhydride (for example, aerosil (NIPPON AEROSIL)), surfactants (for example, anionic surfactants such as sodium alkylsulfate, nonionic surfactants such as polyoxyethylene fatty ester, polyoxyethylene sorbitan fatty ester, polyoxyethylene castor oil derivatives, etc.), colorants (for example, tar colorants, caramel, colcothar, titanium oxide, riboflavins), if necessary, corrigents (for example, sweeteners, flavors, etc.), adsorbents, preservatives, wetting agents, antistatic agents, etc. Furthermore, an organic acid such as tartaric acid, citric acid, succinic acid, fumaric acid or the like can also be added as a stabilizer.

[0488] As the binder above, hydroxypropyl cellulose, polyethylene glycol and polyvinylpyrrolidone, etc. are preferably used.

[0489] The immediate release preparation can be prepared by mixing the components described above and kneading the mixture, if necessary, and then molding according to a conventional technique for making pharmaceutical preparations. The mixing above can be carried out in a conventional manner, e.g., by mixing, kneading, etc. Specifically, where the immediate release preparation is in the form of particles, the preparation can be prepared by mixing components with

a vertical granulator, a multi-purpose kneader (HATA IRON WORKS CO., LTD), a fluidized bed granulator FD-5S (POWREX CORPORATION) or the like, and then granulating the resulting by wet extrusion granulation or fluidized bed granulation by a technique similar to that for preparing the core of the sustained release preparation described above.

[0490] The immediate release preparation and the sustained release preparation thus obtained can be compounded, as they are, or, together with appropriate pharmaceutical excipients, in pharmaceutical preparations separately in a conventional manner to prepare respective preparations for administering in combination with each other simultaneously or at certain time intervals. Alternatively, both preparations may be compounded in a single dosage form for oral administration (e.g., granules, fine granules, tablets, capsules) as they are, or, together with appropriate pharmaceutical excipients. Both preparations in the form of granules or fine granules may also be filled in a single capsule for oral administration.

[3] Sublingual, Buccal or Rapid Oral Disintegrating Preparation and its Production

[0491] A sublingual, buccal or rapid oral disintegrating preparation may be in the form of a solid preparation such as a tablet, or may be in the form of an oral mucosal patch (film).

[0492] The sublingual, buccal or rapid oral disintegrating preparation is preferably a preparation containing the compound of the present invention or a concomitant drug and an excipient. The preparation may also contain auxiliary agents such as a lubricant, an isotonicizing agent, a hydrophilic carrier, a water-dispersible polymer, a stabilizer, etc. Further for the purpose of promoting the absorption and enhancing the bioavailability, the preparation may also contain β -cyclodextrin or β -cyclodextrin derivatives (e.g., hydroxypropyl- β -cyclodextrin, etc.), or the like.

[0493] Examples of the above excipient include lactose, saccharose, D-mannitol, starch, crystalline cellulose, light silicic anhydride, etc. Examples of the lubricant include magnesium stearate, calcium stearate, talc, colloidal silica, etc., with magnesium stearate and colloidal silica being preferred. Examples of the isotonicizing agent include sodium chloride, glucose, fructose, mannitol, sorbitol, lactose, saccharose, glycerin and urea, with mannitol being particularly preferred. As the hydrophilic carrier, there are, for example, a swelling hydrophilic carrier such as crystalline cellulose, ethyl cellulose, crosslinked polyvinylpyrrolidone, light silicic anhydride, silicic acid, dicalcium phosphate, calcium carbonate, etc., with crystalline cellulose (e.g., microcrystalline cellulose, etc.) being preferred. As the water-dispersible polymer, there are, for example, a gum (e.g., tragacanth gum, acacia gum, guar gum), alginate (e.g., sodium alginate), cellulose derivatives (e.g., methyl cellulose, carboxymethylcellulose, hydroxymethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose), gelatin, water-soluble starch, polyacrylic acid (e.g., carbomer), polymethacrylic acid, polyvinyl alcohol, polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, polycarbophil, ascorbate palmitate salt, etc., with hydroxypropylmethyl cellulose, polyacrylic acid, alginate, gelatin, carboxymethylcellulose, polyvinylpyrrolidone and polyethylene glycol being preferred. Hydroxypropylmethyl cellulose is particularly preferred. As

the stabilizer, there are, for example, cysteine, thiosorbitol, tartaric acid, citric acid, sodium carbonate, ascorbic acid, glycine, sodium sulfite, etc., with citric acid and ascorbic acid being particularly preferred.

[0494] The sublingual, buccal or rapid oral disintegrating preparation can be prepared by mixing the compound of the present invention or a concomitant drug and an excipient by a method per se known. Furthermore, if desired, the auxiliary agents described above, such as the lubricant, isotonicizing agent, hydrophilic carrier, water-dispersible polymer, stabilizer, colorant, sweetener, preservative, etc. may also be admixed. After mixing the components described above simultaneously or at certain time intervals, the mixture is compressed into tablets to obtain the sublingual, buccal or oral quick disintegration tablet. In order to obtain a suitable hardness, a solvent such as water, an alcohol, etc. can be used to moisturize or wet the components before or after tableting, followed by drying.

[0495] In preparing the oral mucosal patch (film), the compound of the present invention or a concomitant drug and the water-dispersible polymer (preferably, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose), excipient, etc. described above are dissolved in a solvent such as water, etc. and then the resulting solution is cast into a film. In addition, additives such as a plasticizer, a stabilizer, an antioxidant, a preservative, a colorant, a buffering agent, a sweetener, etc. may be added to the preparation. A glycol such as polyethylene glycol, propylene glycol, etc. may be added to impart an appropriate elasticity to a film, and a bioadhesive polymer (e.g., polycarbophil, carbopol) may also be added to enhance the adhesion of the film to the oral mucosal lining. The casting can be carried out by pouring a solution onto a non-adhesive surface, spreading the solution using a coater such as a doctor blade in a uniform thickness (preferably, approximately 10 to 1000 microns), and then drying the solution to form a film. The film thus formed is dried at room temperature or while warming, and then cut into pieces each having a desired surface area.

[0496] A preferred rapid oral disintegrating preparation is, for example, a rapid diffusion preparation in a solid network form, which comprises the compound of the present invention or a concomitant drug and a water-soluble or water-diffusible carrier inert to the compound of the present invention or the concomitant drug. The network is formed by sublimating a solvent from a solid composition comprising a solution of the compound of the present invention or a concomitant drug in a suitable solvent.

[0497] In addition to the compound of the present invention or a concomitant drug, the composition of the rapid oral disintegrating preparation may preferably contain a matrix-forming agent and a secondary component.

[0498] Examples of the matrix-forming agent include gelatins, dextrans and animal or vegetable proteins from soybean, wheat, psyllium seed proteins, etc.; gummy materials such as gum arabic, guar gum, agar, xanthane gum, etc.; polysaccharides; alginates; carboxymethylcelluloses; carrageenans; dextrans; pectins; synthetic polymers such as polyvinylpyrrolidones; materials derived from gelatin-gum arabic complexes, etc. The matrix-forming agent further includes saccharides such as mannitol, dextrose, lactose, galactose, trehalose, etc.; cyclic saccharides such as cyclodextrins, etc.; inorganic salts such as sodium phosphate,

sodium chloride, aluminum silicate, etc.; amino acids having 2 to 12 carbon atoms such as glycine, L-alanine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-hydroxyproline, L-isoleucine, L-leucine, L-phenylalanine, etc.

[0499] One or more matrix-forming agents can be incorporated into a solution or suspension before solidification. The matrix-forming agents may be present in addition to a surfactant, or may be present in the absence of a surfactant. The matrix-forming agents serve not only to form a matrix itself, but also assist to maintain diffusion of the compound of the present invention or a concomitant drug in the solution or suspension.

[0500] The composition may contain a secondary component such as a preservative, an antioxidant, a surfactant, a thickening agent, a colorant, pH adjusting agent, a flavor, a sweetener, a taste masking agent, etc. As the suitable colorant, there are, for example, iron oxide red, black and yellow, FD & C dyes available from ERIS & EVERALD such as FD & C Blue No. 2 and FD & C Red No. 40, etc. Examples of the suitable flavor include mint, raspberry, licorice, orange, lemon, grapefruit, caramel, vanilla, cherry, grape flavor and a combination thereof. Examples of the suitable pH adjusting agent include citric acid, tartaric acid, phosphoric acid, hydrochloric acid and maleic acid. Examples of the suitable sweetener include aspartame, acesulfame K and thaumatin. Examples of the suitable taste masking agent include sodium bicarbonate, ion exchange resins, cyclodextrin inclusion compounds, adsorbents and microencapsulated apomorphine.

[0501] The preparation generally contains the compound of the present invention or a concomitant drug in an amount of about 0.1 to about 50% by weight, preferably about 0.1 to about 30% by weight and, preferably, the preparation (the sublingual tablet, buccal, etc. described above) allows 90% or more of the compound of the present invention or a concomitant drug to be dissolved (in water) within a time period of about 1 to about 60 minutes, preferably about 1 minute to about 15 minutes, more preferably about 2 minutes to about 5 minutes, or is a rapid oral disintegrating preparation which disintegrates within about 1 to about 60 seconds, preferably about 1 to about 30 seconds, more preferably about 1 to about 10 seconds, after being placed in the oral cavity.

[0502] The amount of the above excipient is about 10 to about 99% by weight, preferably about 30 to about 90% by weight based on the total weight of the preparation. The amount of β -cyclodextrin or β -cyclodextrin derivative is about 0 to about 30% by weight based on the total weight of the preparation. The amount of the lubricant is about 0.01 to about 10% by weight, preferably about 1 to about 5% by weight based on the total weight of the preparation. The amount of the isotonicizing agent is about 0.1 to about 90% by weight, preferably about 10 to about 70% by weight based on the total weight of the preparation. The amount of the hydrophilic carrier is about 0.1 to about 50% by weight, preferably about 10 to about 30% by weight based on the total weight of the preparation. The amount of the water-dispersible polymer is about 0.1 to about 30% by weight, preferably about 10 to about 25% by weight based on the total weight of the preparation. The amount of the stabilizer is about 0.1 to about 10% by weight, preferably about 1 to about 5% by weight based on the total weight of the

preparation. If necessary, the preparation described above may further contain additives such as a colorant, a sweetener, a preservative, etc.

[0503] A dose of the combined preparations of the present invention varies depending upon kind of the compound of the present invention, age, body weight, conditions, dosage form, route for administration, dosing period, etc.

[0504] A dose of the compound of the present invention may vary depending upon subject to be administered, target organ, conditions, route of administration, etc., and in oral administration, the compound is generally administered to the patient with cancer (as 60 kg body weight) in a daily dose of about 0.1 to about 100 mg, preferably about 1.0 to about 50 mg and more preferably about 1.0 to about 20 mg. In parenteral administration, a single dose of the compound may vary depending upon subject to be administered, target organ, conditions, route of administration, etc., and in the form of injectable preparation, it is advantageous to administer the compound intravenously to the patient with cancer (as 60 kg body weight) generally in a daily dose of about 0.01 to about 30 mg, preferably about 0.1 to about 20 mg, and more preferably about 0.1 to about 10 mg. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg weight can be administered. Of course, the dose may vary depending on individual conditions as described above; in such a case, a dose less than the dose given above may be sufficient, or may be higher than the range above.

[0505] It is possible to set any range of a dose for the concomitant drug, so long as it causes no adverse side effects. A daily dose of the concomitant drug may vary depending on the severity of disease, subject's age, sex, body weight and susceptibility, the dosing period and intervals, the characteristics, formulation, type and active components of the pharmaceutical preparation, etc. and is not particularly limited. For example, in oral administration, the dose is about 0.001 to 2000 mg, preferably about 0.01 to 500 mg, and more preferably about 0.1 to 100 mg in terms of a drug; usually, this dose is administered by dividing 1 to 4 times per day.

[0506] When the pharmaceutical preparations of the present invention are administered, the compound and a concomitant drug may be administered at the same time. Alternatively, a concomitant drug is first administered and then the compound of the present invention is administered, or the compound of the present invention is first administered and then a concomitant drug is administered. When they are administered at certain time intervals, the intervals vary depending on the active component to be administered, dosage form and route of administration; when a concomitant drug is first administered, the compound of the present invention may be administered within 1 minute to 3 days, preferably 10 minutes to 1 day, more preferably 15 minutes to 1 hour after the administration of the concomitant drug. When the compound of the present invention is first administered, a concomitant drug may be administered within 1 minute to 1 day, preferably 10 minutes to 6 hours, more preferably 15 minutes to 1 hour after the administration of the compound of the present invention.

[0507] As a preferred method of administration, for example, about 0.001 to 200 mg/kg of a concomitant drug in the form of an oral dosage preparation is administered orally and, after about 15 minutes, about 0.005 to 0.5 mg/kg of the

compound of the present invention in the form of a parenteral preparation is administered parenterally as a daily dose.

[0508] As the metastins, there are used, for example, human metastin described in WO 00/24890, mouse or rat metastin described in WO 01/75104, etc.

[0509] Specific examples of human metastin include a peptide containing the N-terminal 47-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 and consisting of 8 to 54 amino acid residues, and the like.

[0510] The "peptide containing the N-terminal 47-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 and consisting of 8 to 54 amino acid residues" may be any peptide, as far as it is a peptide containing the N-terminal 47-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 and consisting of 8 to 54 amino acid residues, but means that these peptides have substantially the same physiological activity (e.g., a receptor binding activity, a signal transduction activity, a glucose level increasing activity, a pancreatic glucagon secretagogue activity, a urine formation promoting activity, etc.). Specifically, there are used (i) a peptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, (ii) a peptide having the N-terminal 47-54 amino acid sequence at the C terminus in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 and consisting of 8 to 15 amino acid residues, etc.

[0511] More specifically, human metastin used includes (i) a peptide consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (human metastin 54 (1-54)), (ii) a peptide consisting of the N-terminal 40-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (human metastin 15 (40-54); SEQ ID NO: 15), (iii) a peptide consisting of the N-terminal 45-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (human metastin 10 (45-54); SEQ ID NO: 16), (iv) a peptide consisting of the N-terminal 46-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (human metastin 9 (46-54); SEQ ID NO: 17), (v) a peptide consisting of the N-terminal 47-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by (human metastin 8 (47-54); SEQ ID NO: 18), etc.

[0512] As mouse metastin (A), there are used, for example, a peptide containing the N-terminal 134-141 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 and consisting of 8 to 52 amino acid residues. Specific examples of mouse metastin (A) used include (i) a peptide consisting of the N-terminal 90-141 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3, (ii) a peptide consisting of the N-terminal 132-141 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3, (iii) a peptide consisting of the N-terminal 127-141 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3, and the like.

[0513] As mouse metastin (B), there are used, for example, a peptide containing the N-terminal 138-145 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5 and consisting of 8 to 52 amino acid residues. Specific examples of mouse metastin (B) used include a peptide consisting of the N-terminal 94-145 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, and the like.

[0514] As rat metastin, there are used, for example, a peptide containing the N-terminal 112-119 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 and consisting of 8 to 52 amino acid residues. Specific examples of rat metastin used include (i) a peptide consisting of the N-terminal 68-119 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7, (ii) a peptide consisting of the N-terminal 110-119 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7, (iii) a peptide consisting of the N-terminal 105-119 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7, and the like.

[0515] Throughout the specification, the metastins are represented in accordance with the conventional way of describing peptides, that is, the N-terminus (amino terminus) at the left hand and the C-terminus (carboxyl terminus) at the right hand. In the peptide represented by SEQ ID NO: 1, the C-terminus may be in any form of a carboxyl group ($-\text{COOH}$), a carboxylate ($-\text{COO}-$), an amide ($-\text{CONH}_2$) and an ester ($-\text{COOR}$). Herein, examples of the ester group shown by R include a C_{1-6} alkyl group such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, etc.; a C_{3-8} cycloalkyl group such as cyclopentyl, cyclohexyl, etc.; a C_{6-12} aryl group such as phenyl, α -naphthyl, etc.; a C_{7-14} aralkyl such as a phenyl- C_{1-2} alkyl group, e.g., benzyl, phenethyl, etc.; an α -naphthyl- C_{1-2} alkyl group such as α -naphthylmethyl, etc.; pivaloyloxymethyl group, which are widely used as an ester for oral use, and the like.

[0516] Furthermore, the metastins include peptides, wherein the amino group at the N-terminal methionine residue is protected with a protecting group (e.g., a C_{1-6} acyl group such as a C_{2-6} alkanoyl group, e.g., formyl group, acetyl group, etc.); those wherein the N-terminal region is cleaved in vivo and the glutamyl group thus formed is pyroglutaminated; those wherein a substituent (e.g., $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, amino group, imidazole group, indole group, guanidino group, etc.) on the side chain of an amino acid in the molecule is protected with a suitable protecting group (e.g., a C_{1-6} acyl group such as a C_{2-6} alkanoyl group, e.g., formyl group, acetyl group, etc.), or conjugated peptides such as glycopeptides bound to sugar chains.

[0517] For salts of the metastins of the present invention, preferred are salts with physiologically acceptable acids (e.g., inorganic acids or organic acids) or bases (e.g., alkali metal salts), etc., especially physiologically acceptable acid addition salts. Examples of such salts include salts with, for example, inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid); salts with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid) and the like.

[0518] As the DNA encoding the metastin, there are used, for example, DNA encoding human metastin described in WO 00/24890, DNA encoding mouse or rat metastin described in WO 01/75104, etc.

[0519] The DNA encoding the metastin may be any of genomic DNA, genomic DNA library, cDNA derived from the cells and tissues described above, cDNA library derived from the cells and tissues described above and synthetic DNA. The vector to be used for the library may be any of bacteriophage, plasmid, cosmid and phagemid. The DNA

may also be directly amplified by reverse transcriptase polymerase chain reaction (hereinafter abbreviated as RT-PCR) using the total RNA or mRNA fraction prepared from the cells and tissues described above.

[0520] The DNA encoding human metastin, mouse metastin precursor (A), mouse metastin precursor (B) or rat metastin precursor may be any DNA, so long as each is a DNA containing a base sequence represented by SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 8, or a DNA having a base sequence hybridizable to the base sequence represented by any base sequence represented by SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 8 under highly stringent conditions and encoding the human metastin, mouse metastin (A), mouse metastin (B) or rat metastin described above.

[0521] Specific examples of the DNA hybridizable to the base sequence represented by any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 8 under highly stringent conditions include DNAs containing a base sequence having at least about 70% homology, preferably at least about 80% homology, more preferably at least about 90% homology and the most preferably at least about 95% homology, to the base sequence represented by any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 8.

[0522] Homology in the base sequence can be measured under the following conditions (an expectation value=10; gaps are allowed; filtering=ON; match score=1; mismatch score=-3) using the homology scoring algorithm NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool).

[0523] The hybridization can be carried out by per se publicly known methods or by modifications of these methods, for example, according to the method described in Molecular Cloning, 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). A commercially available library may also be used according to the instructions of the attached manufacturer's protocol. Preferably, the hybridization can be carried out under highly stringent conditions.

[0524] The highly stringent conditions used herein are, for example, those in a sodium concentration at about 19 to 40 mM, preferably about 19 to 20 mM at a temperature of about 50 to 70° C., preferably about 60 to 65° C. In particular, hybridization conditions in a sodium concentration of about 19 mM at a temperature of about 65° C. are most preferred.

[0525] Specifically, as the DNA encoding the human metastin consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, the DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO: 2 is used. Accordingly, for the base sequence encoding the human metastin consisting of the various amino acid sequences described above, a base sequence corresponding to each of the partial amino acid sequences in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 may be chosen from the base sequence represented by SEQ ID NO: 2.

[0526] As the DNA encoding the mouse metastin precursor (A) comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3, there are employed a DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO: 4, and the like. Accordingly, for the base sequence encoding the mouse metastin precursor (A) consisting of the various amino acid sequences described above, a base sequence corresponding

to each of the partial amino acid sequences in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3 may be chosen from the base sequence represented by SEQ ID NO: 4.

[0527] As the DNA encoding the mouse metastin precursor (B) comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5, there are employed a DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO: 6, and the like. Accordingly, for the base sequence encoding the mouse metastin precursor (B) consisting of the various amino acid sequences described above, a base sequence corresponding to each of the partial amino acid sequences in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5 may be chosen from the base sequence represented by SEQ ID NO: 6.

[0528] As the DNA encoding the rat metastin comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7, there are employed a DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO: 8, and the like. Accordingly, for the base sequence encoding the rat metastin consisting of the various amino acid sequences described above, a base sequence corresponding to each of the partial amino acid sequences in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 7 may be chosen from the base sequence represented by SEQ ID NO: 8.

[0529] More specifically, for the peptide consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (human metastin 54 (1-54)), a DNA containing the base sequence represented by SEQ ID NO: 2, etc. is used.

[0530] For the peptide consisting of the N-terminal 40-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (human metastin 15 (40-54); SEQ ID NO: 15), a DNA containing the base sequence represented by SEQ ID NO: 19, etc. is used.

[0531] For the peptide consisting of the N-terminal 45-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (human metastin 10 (45-54); represented by SEQ ID NO: 16), a DNA containing the base sequence represented by SEQ ID NO: 20, etc. is used.

[0532] For the peptide consisting of the N-terminal 46-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (human metastin 9 (46-54); represented by SEQ ID NO: 17), a DNA containing the base sequence represented by SEQ ID NO: 21, etc. is used.

[0533] For the peptide consisting of the N-terminal 47-54 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 (human metastin 8 (47-54); represented by SEQ ID NO: 18), a DNA containing the base sequence represented by SEQ ID NO: 22, etc. is used.

[0534] As the metastin receptor, its partial peptides or salts thereof, there are used, for example, a human metastin receptor, its partial peptides or salts thereof described in WO 00/24890, a mouse or rat human metastin receptor, its partial peptides or salts thereof described in WO 01/75104, etc.

[0535] Specifically, the metastin receptor includes a protein containing the same or substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 13, etc.

[0536] The amino acid sequence which has substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID

NO: 13 includes, for example, an amino acid sequence having at least about 70% homology, preferably at least about 80% homology, more preferably at least about 90% homology, and most preferably at least about 95% homology, to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 13.

[0537] Homology of the amino acid sequences can be determined under the following conditions (an expectation value=10; gaps are allowed; matrix=BLOSUM62; filtering=OFF) using a homology scoring algorithm NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool).

[0538] As the protein comprising substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 13, preferred is a protein having substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 13 and having the activity of the same nature as that of a protein consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 13, etc.

[0539] As the activity of substantially the same nature, there are, for example, a ligand binding activity, a signal transduction activity, and the like. The "substantially the same nature" is used to mean that the nature of these activities is equivalent in terms of quality. Thus, the activities such as a ligand binding activity, a signal transduction activity, etc. are preferably equivalent (e.g., about 0.01 to 100 times, preferably about 0.5 to 20 times, more preferably 0.5 to 2 times), but differences in degree such as a level of these activities, quantitative factors such as a molecular weight of the protein may be present and allowable.

[0540] The activities such as a ligand binding activity, a signal transduction activity, etc. can be assayed by per se publicly known method with modifications and may be determined according to methods of determining a ligand or screening methods described in, e.g., WO 00/24890 or WO 01/75104.

[0541] Examples of the metastin receptor used include proteins comprising (i) the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 13, of which at least 1 or 2 (preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 or 2)) amino acids are deleted; (ii) the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 13, to which at least 1 or 2 (preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 or 2)) amino acids are added; (iii) the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 13, in which at least 1 or 2 (preferably about 1 to about 30, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 or 2)) amino acids are substituted by other amino acids; or (iv) a combination of these amino acid sequences; and the like.

[0542] Throughout the specification, the metastin receptors are represented in accordance with the conventional way of describing peptides, that is, the N-terminus (amino terminus) at the left hand and the C-terminus (carboxyl terminus) at the right hand. In the metastin receptors including the metastin receptor represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 13, the C-terminus may be

in any form of a carboxyl group ($-\text{COOH}$), a carboxylate ($-\text{COO}-$), an amide ($-\text{CONH}_2$) and an ester ($-\text{COOR}$). Herein, examples of the ester group shown by R include a C_{1-6} alkyl group such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, etc.; a C_{3-8} cycloalkyl group such as cyclopentyl, cyclohexyl, etc.; a C_{6-12} aryl group such as phenyl, α -naphthyl, etc.; a C_{7-14} aralkyl such as a phenyl- C_{1-2} alkyl group, e.g., benzyl, phenethyl, etc.; an α -naphthyl- C_{1-2} alkyl group such as α -naphthylmethyl, etc.; and pivaloyloxymethyl group, which are widely used as an ester for oral use, and the like.

[0543] Where the metastin receptors contain a carboxyl group (or a carboxylate) at a position other than the C-terminus, the carboxyl group may be amidated or esterified and such amides or esters are also included within the receptor protein of the present invention. In this case, the ester group used may be the same group as the C-terminal esters described above.

[0544] Furthermore, the metastin receptors include those wherein the amino group at the N-terminal methionine residue is protected with a protecting group (e.g., a C_{1-6} acyl group such as a C_{2-6} alkanoyl group, e.g., formyl group, acetyl group, etc.); those wherein the N-terminal region is cleaved in vivo and the glutamyl group thus formed is pyroglutaminated; those wherein a substituent (e.g., $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, amino group, imidazole group, indole group, guanidino group, etc.) on the side chain of an amino acid in the molecule is protected with a suitable protecting group (e.g., a C_{1-6} acyl group such as a C_{2-6} alkanoyl group, e.g., formyl group, acetyl group, etc.), or conjugated proteins such as glycoproteins bound to sugar chains.

[0545] Specific examples of the metastin receptors include human metastin receptor consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, rat metastin receptor consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 11, mouse metastin receptor consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 13, etc.

[0546] The partial peptides of the metastin receptor (hereinafter sometimes simply referred to as the partial peptide) may be any peptide, so long as they are partial peptides of the metastin receptor described above; there are used those such as protein molecules of the metastin receptor, which are the sites exposed outside the cell membrane, and having a ligand binding activity.

[0547] Specifically, the partial peptide of the metastin receptor consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 13 is a peptide containing the parts analyzed to be extracellular domains (hydrophilic domains) in the hydrophobic plotting analysis. A peptide containing a hydrophobic domain in part can be used as well. In addition, the peptide may contain each domain separately or a plurality of domains together.

[0548] In the metastin receptor, preferred partial peptides are those having the number of amino acids of at least 20, preferably at least 50, and more preferably at least 100, in the amino acid sequence described above, which constitutes the metastin receptor.

[0549] The partial peptide may be a peptide having the amino acid sequence described above, of which at least 1 or 2 (preferably about 1 to about 10 and more preferably several (1 or 2)) amino acids are deleted; to which at least

1 or 2 (preferably about 1 to about 20, more preferably about 1 to about 10 and most preferably several (1 or 2)) amino acids are added; or, in which at least 1 or 2 (preferably about 1 to about 10 and more preferably several (1 or 2)) amino acids are substituted by other amino acids.

[0550] In the partial peptide, the C terminus may be any form of a carboxyl group ($-\text{COOH}$), a carboxylate ($-\text{COO}-$), an amide ($-\text{CONH}_2$) and an ester ($-\text{COOR}$), as in the metastin receptor described above.

[0551] Furthermore, the partial peptides include peptides, wherein the amino group at the N-terminal methionine residue is protected with a protecting group; those wherein the N-terminal region is cleaved in vivo and the Gln thus formed is pyroglutaminated; those wherein a substituent on the side chain of an amino acid in the molecule is protected with a suitable protecting group, or conjugated peptides such as glycopeptides bound to sugar chains, as in the metastin receptors described above.

[0552] For salts of the metastin receptor or the partial peptide, preferred are salts with physiologically acceptable acids, especially physiologically acceptable acid addition salts. Examples of the salts include salts with, for example, inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid); salts with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid) and the like.

[0553] As the DNA encoding the metastin receptor or its partial peptides, there are used, for example, a DNA encoding the human metastin receptor or its partial peptides described in WO 00/24890, a DNA encoding the mouse or rat metastin receptor or its partial peptides described in WO 01/75104, etc.

[0554] The DNA encoding the metastin receptor or its partial peptides may be any of genomic DNA, genomic DNA library, cDNA derived from the cells and tissues described above, cDNA library derived from the cells and tissues described above and synthetic DNA. The vector to be used for the library may be any of bacteriophage, plasmid, cosmid and phagemid. The DNA may also be directly amplified by reverse transcriptase polymerase chain reaction (hereinafter abbreviated as RT-PCR) using the total RNA or mRNA fraction prepared from the cells and tissues described above.

[0555] Specifically, the DNA encoding human metastin receptor, mouse metastin receptor or rat metastin receptor may be any DNA, so long as it is a DNA containing each base sequence represented by SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 or SEQ ID NO: 14, or a DNA containing a base sequence hybridizable to the base sequence represented by SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 or SEQ ID NO: 14 under highly stringent conditions and encoding a receptor having the activity of substantially the same nature (e.g., a ligand binding activity, a signal transduction activity, etc.) as that of the human metastin receptor, mouse metastin receptor or rat metastin receptor consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 or SEQ ID NO: 14.

[0556] Examples of the DNA hybridizable to the base sequence represented by any of SEQ ID NO: 10, SEQ ID

NO: 12 or SEQ ID NO: 14 include DNAs containing a base sequence having at least about 70% homology, preferably at least about 80% homology, more preferably at least about 90% homology and the most preferably at least about 95% homology, to the base sequence represented by any of SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 or SEQ ID NO: 14.

[0557] Homology in the base sequence can be measured under the following conditions (an expectation value=10; gaps are allowed; filtering=ON; match score=1; mismatch score=-3) using the homology scoring algorithm NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool).

[0558] The hybridization can be carried out by publicly known methods or by modifications of these methods, for example, according to the method described in Molecular Cloning, 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989), etc. A commercially available library may also be used according to the instructions of the attached manufacturer's protocol. Preferably, the hybridization can be carried out under highly stringent conditions.

[0559] The highly stringent conditions used herein are, for example, those in a sodium concentration at about 19 to 40 mM, preferably about 19 to 20 mM at a temperature of about 50 to 70° C., preferably about 60 to 65° C. In particular, hybridization conditions in a sodium concentration of about 19 mM at a temperature of about 65° C. are most preferred.

[0560] More specifically, as the DNA encoding the human metastin receptor consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9, the DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO: 10 is used.

[0561] As the DNA encoding the rat metastin receptor consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 11, the DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO: 12 is used.

[0562] As the DNA encoding the mouse metastin receptor consisting of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 13, the DNA consisting of the base sequence represented by SEQ ID NO: 14 is used.

[0563] The metastin receptors, their partial peptides or salts thereof and the DNAs encoding the metastin receptors or their partial peptides can be obtained or manufactured by the methods described in WO 00/24890 or WO 01/75104.

[0564] As the antibodies to human metastin or its salts or human metastin receptors, their partial peptides or salts thereof, there may be used those described in WO 00/24890.

[0565] As the antibodies to mouse or rat metastin or its salts, or mouse or rat metastin receptors, their partial peptides or salts thereof, there may be used those described in WO 01/75104.

[0566] The antisense polynucleotide to the DNA encoding the metastin or metastin receptor is a polynucleotide containing a part of the base sequence of a DNA encoding the metastin or metastin receptor or a part of the complementary base sequence to the DNA. The antisense polynucleotide is used to embrace not only the DNA encoding the metastin or metastin receptor but also RNA.

[0567] The antisense polynucleotide (nucleic acid) capable of inhibiting the replication or expression of a gene for metastin or a gene for metastin receptor can be designed

and synthesized based on the base sequence information of cloned or identified metastin-encoding DNA. Such a polynucleotide (nucleic acid) is hybridizable to RNA of a gene for metastin or a gene for the metastin receptor to inhibit the synthesis or function of said RNA or is capable of regulating/controlling the expression of a gene for metastin or a gene for metastin receptor via interaction with RNA associated with the metastin or metastin receptor.

[0568] Polynucleotides complementary to the selected sequences of metastin-related RNA or metastin receptor-related RNA and polynucleotides specifically hybridizable to the metastin-related RNA or metastin receptor-related RNA are useful in regulating/controlling the expression of a gene for metastin or a gene for metastin receptor in vivo and in vitro. These polynucleotides are also useful for the treatment or diagnosis of diseases, etc. The term "corresponding" is used to mean homologous to or complementary to a particular sequence of the nucleotide including the gene, base sequence or nucleic acid. The term "corresponding" between nucleotides, base sequences or nucleic acids and peptides (proteins) usually refers to amino acids of a peptide (protein) under the order derived from the sequence of nucleotides (nucleic acids) or their complements.

[0569] In the gene for metastin or gene for the metastin receptor, the 5' end hairpin loop, 5' end 6-base-pair repeats, 5' end untranslated region, peptide translation initiation codon, protein coding region, ORF translation termination codon, 3' end untranslated region, 3' end palindrome region, and 3' end hairpin loop, may be selected as preferred target regions, though any other region may be selected as a target in the gene for metastin or gene for the metastin receptor.

[0570] The relationship between the targeted nucleic acids and the complementary polynucleotides at least to a part of the target, specifically the relationship between the target and the polynucleotides hybridizable to the target, can be denoted to be "antisense". Examples of the antisense polynucleotides include polydeoxyribonucleotides containing 2-deoxy-D-ribose, polyribonucleotides containing D-ribose, any other type of polynucleotides which are N-glycosides of a purine or pyrimidine base, or other polymers containing non-nucleotide backbones (e.g., protein, nucleic acids and synthetic sequence-specific nucleic acid polymers commercially available) or other polymers containing nonstandard linkages (provided that the polymers contain nucleotides having such a configuration that allows base pairing or base stacking, as is found in DNA or RNA), etc. The antisense polynucleotides may be double-stranded DNA, single-stranded DNA, single-stranded RNA or a DNA:RNA hybrid, and may further include unmodified polynucleotides (or unmodified oligonucleotides), those with publicly known types of modifications, for example, those with labels known in the art, those with caps, methylated polynucleotides, those with substitution of one or more naturally occurring nucleotides by their analogue, those with intramolecular modifications of nucleotides such as those with uncharged linkages (e.g., methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoramidates, carbamates, etc.) and those with charged linkages or sulfur-containing linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.), those having side chain groups such as proteins (nucleases, nuclease inhibitors, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), saccharides (e.g., monosaccharides, etc.), those with intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.), those containing chelators (e.g., metals,

radioactive metals, boron, oxidative metals, etc.), those containing alkylating agents, those with modified linkages (e.g., α anomeric nucleic acids, etc.), and the like. Herein the terms "nucleoside", "nucleotide" and "nucleic acid" are used to refer to moieties that contain not only the purine and pyrimidine bases, but also other heterocyclic bases, which have been modified. Such modifications may include methylated purines and pyrimidines, acylated purines and pyrimidines and other heterocyclic rings. Modified nucleotides and modified nucleotides also include modifications on the sugar moiety, wherein, for example, one or more hydroxyl groups may optionally be substituted with a halogen atom(s), an aliphatic group(s), etc., or may be converted into the corresponding functional groups such as ethers, amines, or the like.

[0571] The antisense nucleotide (nucleic acid) is RNA, DNA, or a modified nucleic acid (RNA or DNA). Specific examples of the modified nucleic acid include, but are not limited to, a sulfur derivative of a nucleic acid, a thiophosphate derivative of a nucleic acid, and a degradation-resistant polynucleoside amide or oligonucleoside amide. The antisense nucleic acid of the present invention may preferably be designed based on the following principles. That is, the antisense nucleic acid should be more stable in cells; the cell permeability of the antisense nucleic acid should be more enhanced; the affinity for a target sense strand should be higher; and if the antisense nucleic acid has any toxicity, such toxicity should be minimized.

[0572] Many modification techniques for such purposes are known in the art, for example, the techniques are disclosed in J. Kawakami et al., *Pharm Tech Japan*, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al., ed. *Antisense Research and Applications*, CRC Press, 1993; etc.

[0573] The antisense nucleic acid of the present invention may contain altered or modified sugars, bases or linkages. The antisense nucleic acid may also be provided in a special form such as liposomes, microspheres, or may be applied to gene therapy, or may be provided in an added form. Examples of such an added form include polycations such as polylysine that serves to neutralize the charge of a phosphate backbone, or hydrophobic materials such as lipids (e.g., phospholipids, cholesterol, etc.) that enhance the interaction with cell membranes or increase uptake of the nucleic acid. Examples of the preferred lipids to be added are cholesterol or derivatives thereof (e.g., cholesteryl chloroformate, cholic acid, etc.). These materials may be added to the 3' or 5' end of the nucleic acid or may be added through a base, a sugar, or an intramolecular nucleoside linkage. Another moiety may include a group for capping that is specifically placed at the 3' or 5' end of the nucleic acid to prevent degradation by a nuclease such as exonuclease and RNase. Examples of the group for capping include, but are not limited to, hydroxyl-protecting groups known in the art field such as glycyls, e.g., polyethylene glycol and tetraethylene glycol.

[0574] The inhibiting activity of the antisense nucleic acid can be examined using a transformant transformed by the transformant vector containing the DNA encoding the metastin or metastin receptor described above, an in vivo or in vitro expression system for the metastin or metastin receptor, or an in vivo or in vitro translation system for the

metastin or metastin receptor. The nucleic acid itself may be applied to cells by a variety of per se publicly known methods.

[0575] Hereinafter, the metastin or salts thereof (hereinafter briefly referred to as metastin), the DNA encoding metastin, the antibody to metastin, the anti DNA to the DNA encoding metastin, the metastin receptor, its partial peptides or salts thereof (hereinafter briefly referred to as the metastin receptor), the DNA encoding the metastin receptor, the antibody to the metastin receptor, the anti DNA to the DNA encoding the metastin receptor, etc. are described specifically in terms of their applications.

(1) Pharmaceutical Comprising Metastin, DNA Encoding Metastin, Metastin Receptor or DNA Encoding Metastin Receptor

[0576] Metastin has the effects of increasing glucose level, promoting pancreatic glucagon secretion and promoting urine formation. Therefore, metastin, the DNA encoding metastin, the metastin receptor or the DNA encoding the metastin receptor is useful, for example, as a hyperglycemic agent, a pancreatic glucagon secretagogue agent or a urine formation promoting agent.

[0577] Moreover, metastin, the DNA encoding metastin, the metastin receptor or the DNA encoding the metastin receptor is useful as an agent for preventing/treating, e.g., obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity.

[0578] Metastin, the DNA encoding metastin, the metastin receptor or the DNA encoding the metastin receptor can be used as the pharmaceutical described above in a conventional manner. These metastin, etc. can be used orally, for example, in the form of tablets which may be sugar coated if necessary, capsules, elixirs, microcapsules etc., or parenterally in the form of injectable preparations such as a sterile solution or suspension in water or other pharmaceutically acceptable liquid. These preparations can be manufactured by mixing metastin or the like with a physiologically acceptable carrier, a flavoring agent, an excipient, a vehicle, an antiseptic agent, a stabilizer, a binder, etc. in a unit dosage form required in a generally accepted manner that is applied to making pharmaceutical preparations. The active ingredient in these preparations is controlled in such a dose that an appropriate dose is obtained within the specified range given.

[0579] The DNA encoding the metastin or the DNA encoding the metastin receptor is expressed (a) by administering the DNA encoding the metastin or the DNA encoding the metastin receptor directly to the patient; or the DNA encoding the metastin or the DNA encoding the metastin receptor can increase the amount of the metastin or metastin receptor in the patient (b) by inserting the DNA encoding the metastin or the DNA encoding the metastin receptor into a cell, etc. and then transplanting the cell to the patient. Thus, the activity of metastin can be sufficiently exhibited.

[0580] Where the DNA encoding the metastin or the DNA encoding the metastin receptor is used, the DNA itself is administered; alternatively, the DNA is inserted into an

appropriate vector such as retrovirus vector, adenovirus vector, adenovirus-associated virus vector, etc. and then administered in a conventional manner.

[0581] Additives miscible with tablets, capsules, etc. include a binder such as gelatin, cornstarch, tragacanth and gum arabic, an excipient such as crystalline cellulose, a swelling agent such as cornstarch, gelatin, alginate acid, etc., a lubricant such as magnesium stearate, a sweetening agent such as sucrose, lactose and saccharin, and a flavoring agent such as peppermint, akamono oil or cherry, etc. When the unit dosage is in the form of capsules, liquid carriers such as oils and fats may further be used together with the additives described above. A sterile composition for injection may be formulated according to a conventional manner used to make pharmaceutical compositions, e.g., by dissolving or suspending the active ingredients in a vehicle such as water for injection with a naturally occurring vegetable oil such as sesame oil and coconut oil, etc. to prepare the pharmaceutical composition.

[0582] Examples of an aqueous medium for injection include physiological saline and an isotonic solution containing glucose and other auxiliary agents (e.g., D-sorbitol, D-mannitol, sodium chloride, etc.) and may be used in combination with an appropriate dissolution aid such as an alcohol (e.g., ethanol or the like), a polyalcohol (e.g., propylene glycol and polyethylene glycol), a nonionic surfactant (e.g., polysorbate 80TM and HCO-50), etc. Examples of the oily medium include sesame oil and soybean oil, which may also be used in combination with a dissolution aid such as benzyl benzoate and benzyl alcohol.

[0583] The preparation may further be formulated with a buffer (e.g., phosphate buffer, sodium acetate buffer, etc.), a soothing agent (e.g., benzalkonium chloride, procaine hydrochloride, etc.), a stabilizer (e.g., human serum albumin, polyethylene glycol, etc.), a preservative (e.g., benzyl alcohol, phenol, etc.), an antioxidant, etc. The thus-prepared liquid for injection is normally filled in an appropriate ampoule. Since the thus obtained pharmaceutical preparation is safe and low toxic, the preparation can be administered to human or other mammals (e.g., mice, rats, guinea pigs, rabbits, fowl, sheep, swine, bovine, cats, dogs, monkeys, hamadryad baboons, chimpanzees, etc.).

[0584] The dose of metastin, the DNA encoding metastin, the metastin receptor or the DNA encoding the metastin receptor varies depending on conditions, etc.; in oral administration for the treatment of, e.g., obesity, the dose is normally about 0.1 mg to about 100 mg, preferably about 1.0 to about 50 mg, and more preferably about 1.0 to about 20 mg per day for the adult patient with obesity (as 60 kg body weight). In parenteral administration, the single dose varies depending on subject to be administered, target disease, conditions, method of administration, etc. but it is advantageous to administer the active ingredient intravenously to the adult patient with obesity (as 60 kg body weight) intravenously at a daily dose of about 0.01 to about 30 mg, preferably about 0.1 to about 20 mg, and more preferably about 0.1 to about 10 mg for. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg body weight can be administered.

(2) Pharmaceutical Comprising the Antibody to the Metastin or Metastin Receptor

[0585] The antibody to neutralize the activity of the metastin or metastin receptor can suppress the effects of increasing

glucose level, promoting pancreatic glucagon secretion and promoting urine formation, and is thus useful as a hypoglycemic agent, a pancreatic glucagon secretion suppressing agent or a urine formation suppressing agent.

[0586] Furthermore, the antibody having the effect of neutralizing the activity of the metastin or metastin receptor can be used as an agent for preventing/treating, e.g., diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, pollakiuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning. Diabetes mellitus includes insulin-dependent (type I) diabetes, insulin-independent type II diabetes, etc.

[0587] The agent for treating/preventing the diseases described above comprising the antibody to the metastin or metastin receptor (hereinafter briefly referred to as the antibody of the present invention) can be administered to human or mammal (e.g., rat, rabbit, sheep, swine, bovine, cat, dog, monkey, etc.) orally or parenterally directly as a liquid preparation, or as a pharmaceutical composition of suitable dosage form. The dose may vary depending upon subject to be administered, target disease, conditions, route of administration, etc. For example, when the agent is used for adult, it is advantageous to intravenously administer the antibody of the present invention in a single dose of about 0.01 to about 20 mg/kg body weight, preferably about 0.1 to about 10 mg/kg body weight and more preferably about 0.1 to about 5 mg/kg body weight in approximately 1 to 5 times a day, preferably in approximately 1 to 3 times a day. In other parenteral administration and oral administration, the agent can be administered in a dose corresponding to the dose given above. When the condition is especially severe, the dose may be increased according to the condition.

[0588] The antibody of the present invention may be administered in itself or in the form of an appropriate pharmaceutical composition. The pharmaceutical composition used for the administration may contain a pharmacologically acceptable carrier with the aforesaid antibody or its salts, a diluent or excipient. Such a composition is provided in the form of pharmaceutical preparations suitable for oral or parenteral administration.

[0589] For example, the composition for oral administration includes solid or liquid preparations, specifically, tablets (including dragees and film-coated tablets), pills, granules, powdery preparations, capsules (including soft capsules), syrup, emulsions, suspensions, etc. Such a composition is manufactured by publicly known methods and contains a vehicle, a diluent or excipient conventionally used in the field of pharmaceutical preparations. Examples of the vehicle or excipient for tablets are lactose, starch, sucrose, magnesium stearate, etc.

[0590] Examples of the composition for parenteral administration are injectable preparations, suppositories, etc. The injectable preparations include intravenous injections, subcutaneous injections, intracutaneous injections, intramuscular injections, drip infusions, etc. These injectable preparations may be prepared by methods publicly known. For example, the injectable preparations may be prepared by dissolving, suspending or emulsifying the antibody or its salt described above in a sterile aqueous medium or an oily medium conventionally used for injections. As the aqueous

medium for injections, there are, for example, physiological saline, an isotonic solution containing glucose and other auxiliary agents, etc., which may be used in combination with an appropriate solubilizing agent such as an alcohol (e.g., ethanol), a polyalcohol (e.g., propylene glycol, polyethylene glycol), a nonionic surfactant [e.g., polysorbate 80, HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)], etc. As the oily medium, there are employed, e.g., sesame oil, soybean oil, etc., which may be used in combination with a solubilizing agent such as benzyl benzoate, benzyl alcohol, etc. The injection thus prepared is usually filled in an appropriate ampoule. The suppository used for rectal administration may be prepared by blending the aforesaid antibody or its salt with conventional bases for suppositories.

[0591] Advantageously, the pharmaceutical compositions for oral or parenteral use described above are prepared into pharmaceutical preparations in a unit dose suitable for a dose of the active ingredients. Such unit dose preparations include, for example, tablets, pills, capsules, injections (ampoules), suppositories, etc. The amount of the aforesaid antibody contained is generally about 5 to 500 mg per dosage unit form; especially in the form of injection, it is preferred that the aforesaid antibody is contained in about 5 to 100 mg and in about 10 to 250 mg for the other forms.

[0592] Each composition described above may further contain other active components unless they cause any adverse interaction with the antibody described above.

(3) Diagnostic Agent Comprising the Antibody of the Present Invention

[0593] The antibody of the present invention is capable of specifically recognizing the metastin receptor and therefore can be used for quantitative determination of the metastin receptor in a fluid to be tested, in particular, for quantitative determination by the sandwich immunoassay. The quantitative determination using the antibody of the present invention can be performed by the method described in WO 00/24890 or WO 01/75104.

[0594] Accordingly, the antibody of the present invention can detect blood glucose abnormalities, abnormalities in pancreatic glucagon secretion, and abnormalities in urine formation, accompanied by abnormal expression (overexpression or decreased expression) of the metastin or metastin receptor. Specifically, the antibody of the present invention can be used as a diagnostic agent for obesity, hyperlipemia, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders, lipotoxicity, diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, pollakiuria, nocturnal enuresis, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia, deficits in memory and learning, etc., which may be caused by blood glucose abnormalities, abnormalities in pancreatic glucagon secretion, and abnormalities in urine formation, accompanied by abnormal expression of the metastin or metastin receptor in human or mammals (e.g., rats, rabbits, sheep, swine, bovine, cats, dogs, monkeys, etc.).

[0595] More specifically, when a decreased level of the metastin or metastin receptor is detected by quantifying the

level of the metastin or metastin receptor using the antibody of the present invention, it can be diagnosed that one suffers from diseases associated with dysfunction of the metastin or metastin receptor; or it is highly likely to suffer from these disease in the future.

[0596] Moreover, when a increased level of the metastin or metastin receptor is detected, it can be diagnosed that one suffers from diseases caused by over-expression of the metastin or metastin receptor; or it is highly likely to suffer from these disease in the future.

[0597] The diseases associated with dysfunction of the metastin or metastin receptor include, e.g., obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity.

[0598] The diseases associated with overexpression of the metastin or metastin receptor include, e.g., diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, pollakiuria, nocturnal enuresis, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia, deficits in memory and learning, etc. Diabetes mellitus includes insulin-dependent (type I) diabetes, insulin-independent type II diabetes, etc.

(4) Gene Diagnostic Agent

[0599] By using the DNA encoding the metastin or metastin receptor or the antisense polynucleotide to the DNA, e.g., as a probe, abnormality (gene abnormality) of the DNA or mRNA encoding the metastin or metastin receptor in human or other mammal (e.g., rat, mouse, guinea pig, rabbit, fowl, sheep, swine, bovine, horse, cat, dog, monkey, etc.) can be detected. Thus, the DNA or the antisense polynucleotide is useful as a gene diagnostic agent for the damage to the DNA or mRNA, mutation, a decreased expression, or an increased expression or overexpression of the DNA or mRNA.

[0600] The gene diagnosis described above using the DNA encoding the metastin or metastin receptor can be made, e.g., by the publicly known Northern hybridization assay or the PCR-SSCP assay (Genomics, 5, 874-879 (1989); Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 2766-2770 (1989)), etc.

[0601] Specifically, the DNA encoding the metastin or metastin receptor or the antisense polynucleotide to the DNA can be used as a diagnostic agent for obesity, hyperlipemia, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders, lipotoxicity, diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, pollakiuria, nocturnal enuresis, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia, deficits in memory and learning, etc., which may be caused by glucose abnormalities, abnormalities in pancreatic glucagon secretion, and abnormalities in urine formation, accompanied by abnormal expression of the metastin or metastin receptor in human or mammals.

[0602] When a decreased expression of the metastin or metastin receptor is detected, e.g., by Northern hybridiza-

tion, it can be diagnosed that one is likely to suffer from diseases associated with dysfunction of the metastin or metastin receptor, or it is highly likely for one to suffer from diseases in the future.

[0603] When overexpression of the metastin or metastin receptor is detected by Northern hybridization, it can be diagnosed that one is likely to suffer from diseases caused by overexpression of the metastin or metastin receptor, or it is highly likely for one to suffer from these diseases in the future.

[0604] The diseases associated with dysfunction of the metastin or metastin receptor include, e.g., obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders, lipotoxicity, etc.

[0605] The diseases associated with overexpression of the metastin or metastin receptor include, e.g., diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, pollakiuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia, deficits in memory and learning, etc. Diabetes mellitus includes insulin-dependent (type I) diabetes, insulin-independent type II diabetes, etc.

(5) Pharmaceutical Comprising Antisense DNA

[0606] The antisense DNA to the DNA encoding the metastin or metastin receptor can suppress the effects of increasing glucose level, promoting pancreatic glucagon secretion or promoting urine formation, and is thus useful as a hypoglycemic agent, a pancreatic glucagon secretion suppressing agent or a urine formation suppressing agent.

[0607] Furthermore, the antisense DNA to the DNA encoding the metastin or metastin receptor can be used as an agent for preventing/treating, e.g., diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, pollakiuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning. Diabetes mellitus includes insulin-dependent (type I) diabetes, insulin-independent type II diabetes, etc.

[0608] Where the antisense DNA described above is used as the aforesaid agent for the treatment/prevention, the antisense DNA is prepared into pharmaceutical preparations as in the DNA encoding the metastin.

[0609] Since the pharmaceutical composition thus obtained is low toxic, it can be administered to human or mammals (e.g., rats, rabbits, sheep, swine, bovine, cats, dogs, monkeys, etc.) orally or parenterally.

[0610] The antisense DNA may also be administered as an intact DNA, or prepared into pharmaceutical preparations together with a physiologically acceptable carrier such as an auxiliary agent to assist its uptake and administered by gene gun or through a catheter such as a catheter with a hydrogel.

[0611] A dose of the antisense DNA may vary depending on target disease, subject to be administered, route for administration, etc. For example, where the antisense DNA

is locally administered to the organ (e.g., liver, lung, heart, kidney, etc.) for the purpose of treating diabetes mellitus, the antisense DNA is generally administered to adult (60 kg body weight) in a daily dose of about 0.1 to 100 mg.

[0612] In addition, the double-stranded RNA (RNAi; RNA interference) comprising a part of RNA encoding the metastin or metastin receptor, the ribozyme comprising a part of RNA encoding the metastin or metastin receptor, etc. can suppress the expression of the DNA encoding the metastin or metastin receptor as in the antisense DNA described above, and can suppress the function of the metastin or metastin receptor or the DNA encoding the metastin or metastin receptor in vivo.

[0613] Therefore, the double-stranded RNA or ribozyme can suppress the effects of increasing glucose level, promoting pancreatic glucagon secretion or promoting urine formation, and is thus useful as a hypoglycemic agent, a pancreatic glucagon secretion suppressing agent or a urine formation suppressing agent. Moreover, the double-stranded RNA or ribozyme can be used as an agent for preventing/treating diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, pollakiuria, nocturnal enuresis, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning. Diabetes mellitus includes insulin-dependent (type I) diabetes, insulin-independent type II diabetes, etc.

[0614] The double-stranded RNA can be designed based on a sequence of the DNA of the present invention and manufactured by modifications of publicly known methods (e.g., Nature, 411, 494, 2001).

[0615] The ribozyme can be designed based on a sequence of the DNA of the metastin or metastin receptor and manufactured by modifications of publicly known methods (e.g., TRENDS in Molecular Medicine, 7, 221, 2001). For example, the ribozyme can be manufactured by ligating a publicly known ribozyme to a part of the RNA encoding the metastin or metastin receptor. A part of the RNA encoding the metastin or metastin receptor includes a portion proximal to a cleavage site on the RNA of the metastin or metastin receptor, which may be cleaved with a publicly known ribozyme (RNA fragment).

[0616] Where the double-stranded RNA or ribozyme described above is used as the prophylactic/therapeutic agent described above, the double-stranded RNA or the ribozyme is prepared into pharmaceutical preparations as in the antisense DNA, and the preparations can be provided for administration.

(6) Screening Method

[0617] The screening method of the present invention includes:

[0618] (6-1) a method of screening a blood glucose regulating agent, a pancreatic glucagon regulating agent or a urine formation regulating agent, which comprises using (a) metastin and/or (b) a metastin receptor (hereinafter including its partial peptide), and,

[0619] (6-2) a method of screening a blood glucose regulating agent, a pancreatic glucagon regulating agent or a urine formation regulating agent, which comprises using (a)

a DNA comprising a DNA encoding metastin and/or (b) a DNA encoding a metastin receptor.

[0620] The blood glucose regulating agent, pancreatic glucagon regulating agent or urine formation regulating agent includes:

(a) a substance that alters the binding property of metastin to a metastin receptor, or,

(b) a substance that regulates the expression of metastin and/or a metastin receptor, etc.

[0621] First, the screening method is described on the substance that alters the binding property of metastin to a metastin receptor.

[0622] By using the metastin receptor, or by constructing the expression system of the recombinant metastin receptor and using the receptor-binding assay system via the expression system, the substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor can be screened.

[0623] Such a substance includes a substance having the cell-stimulating activity mediated by the metastin receptor (i.e., a metastin receptor agonist), a substance having no cell-stimulating activity (i.e., a metastin receptor antagonist), etc. The term "alters the binding property of metastin to the metastin receptor" is used to include both cases where binding of metastin to the metastin receptor is inhibited and binding of metastin to the metastin receptor is promoted.

[0624] The cell-stimulating activity includes, e.g., the activities that promote or suppress arachidonic acid release, acetylcholine release, intracellular Ca^{2+} release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, changes in cell membrane potential, phosphorylation of intracellular proteins, activation of c-fos, pH reduction, etc., the cell proliferation inhibiting activity, chemotaxis inhibiting activity, tumor growth suppressing activity, hyperglycemic activity, pancreatic glucagon secretion promoting activity, etc. Among others, the activities of promoting intracellular Ca^{2+} release, inhibiting cell proliferation, inhibiting chemotaxis, suppressing tumor growth, increasing blood glucose and promoting pancreatic glucagon secretion are preferred.

[0625] That is, the present invention provides a method of screening a substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor, which comprises assaying the binding amount of a labeled form of the metastin to metastin receptor, (i) in the case wherein metastin is brought in contact with a metastin receptor and (ii) in the case wherein metastin and a test compound are brought in contact with the metastin receptor, and comparing (i) and (ii);

[0626] According to the screening method of the present invention, the method comprises assaying, for example, the binding amount of metastin to the metastin receptor, the cell-stimulating activity, etc. (i) in the case wherein metastin is brought in contact with the metastin receptor and (ii) in the case wherein the peptide of the present invention and a test compound are brought in contact with the metastin receptor, and comparing (i) and (ii).

[0627] Specifically, the screening method of the present invention includes:

[0628] (i) a method of screening a substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor, which

comprises assaying the binding amount of labeled metastin to the metastin receptor, in the case wherein labeled metastin is brought in contact with the metastin receptor and in the case wherein labeled metastin and a test compound are brought in contact with the metastin receptor, and comparing the binding amount between the cases;

[0629] (ii) a method of screening a substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor, which comprises assaying the binding amount of labeled metastin to a cell containing the metastin receptor or a membrane fraction of the cell, in the case wherein labeled metastin is brought in contact with the cell containing the metastin receptor or its membrane fraction and in the case wherein labeled metastin and a test compound are brought in contact with the cell containing metastin receptor or its membrane fraction, and comparing the binding amount between the cases;

[0630] (iii) a method of screening a substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor, which comprises assaying the binding amount of labeled metastin to the metastin receptor, in the case wherein labeled metastin is brought in contact with the metastin receptor expressed on a cell membrane by culturing a transformant containing a DNA encoding the metastin receptor and in the case wherein labeled metastin and a test compound are brought in contact with the metastin receptor expressed on a cell membrane by culturing a transformant containing a DNA encoding the metastin receptor, and comparing the binding amount between the cases;

[0631] (iv) a method of screening a substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor, which comprises assaying the cell-stimulating activity mediated by the metastin receptor, in the case wherein a compound that activates the metastin receptor (e.g., metastin, the metastin derivative of the present invention) is brought in contact with a cell containing the metastin receptor and in the case wherein the compound that activates the metastin receptor and a test compound are brought in contact with a cell containing the metastin receptor, and comparing the activity;

[0632] (v) a method of screening a substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor, which comprises assaying the cell-stimulating activity mediated by the metastin receptor, in the case wherein a compound that activates the metastin receptor (e.g., metastin or the metastin derivative of the present invention) is brought in contact with the metastin receptor expressed on a cell membrane by culturing a transformant containing a DNA encoding the metastin receptor and in the case wherein the compound that activates the metastin receptor and a test compound are brought in contact with the metastin receptor expressed on a cell membrane by culturing a transformant containing a DNA encoding the metastin receptor, and comparing the activity; etc.

[0633] (vi) a method of screening the metastin receptor, which comprises assaying the cell-stimulating activity mediated by the metastin receptor when a test compound is brought in contact with a cell containing the metastin receptor and comparing the activity;

[0634] (vii) a method of screening an agonist for the metastin receptor, which comprises assaying the cell-stimu-

lating activity mediated by the metastin receptor when a test compound is brought in contact with the metastin receptor expressed on a cell membrane by culturing a transformant containing a DNA encoding the metastin receptor and comparing the activity; and the like.

[0635] In the screening method of the present invention, a compound (e.g., a low molecular synthetic compound, preferably a low molecular synthetic agonist) or its salt that alters the binding property of metastin to the metastin receptor can also be used as a ligand, instead of using metastin. The compound or its salt that alters the binding property of metastin to the metastin receptor can be obtained by performing the screening method of the present invention, using, e.g., metastin as a ligand. Specifically, the metastin derivative of the present invention or its salts described above can be used.

[0636] The screening method of the present invention will be described below more specifically.

[0637] First, the metastin receptor, which is used for the screening method of the present invention, may be any receptor, so long as it comprises the metastin receptor described above, and membrane fractions from human or other warm-blooded animal organs are preferably employed. Since it is very difficult to obtain human-derived organs especially, however, the metastin receptor expressed abundantly by use of recombinants are suitable for use in the screening.

[0638] Where the cell containing the metastin receptor or its cell membrane fraction is used in the screening method of the present invention, the procedures later described may apply.

[0639] When the cell containing metastin receptor is used, the cell may be fixed with glutaraldehyde, formalin, etc. The fixation may be carried out by a publicly known method.

[0640] The cell containing metastin receptor refers to a host cell expressing the metastin receptor. Examples of such a host cell include *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, yeast, insect cells, animal cells, etc.

[0641] The membrane fraction refers to a fraction that abundantly contains cell membranes prepared by publicly known methods after disrupting cells. Examples of the cell disruption include cell squashing using a Potter-Elvehjem homogenizer, disruption using a Waring blender or Polytron (manufactured by Kinematica Inc.), disruption by ultrasonication, disruption by cell spraying via a thin nozzle under increasing pressure using a French press, etc., and the like. Cell membranes are fractionated mainly by fractionation using a centrifugal force such as for fractionation centrifugation, density gradient centrifugation, etc. For example, cell disruption fluid is centrifuged at a low rate (500 rpm to 3,000 rpm) for a short period of time (normally about 1 minute to about 10 minutes), the resulting supernatant is then centrifuged at a higher rate (15,000 rpm to 30,000 rpm) normally for 30 minutes to 2 hours. The precipitate thus obtained is used as the membrane fraction. The membrane fraction is rich in the metastin receptor expressed and membrane components such as cell-derived phospholipids, membrane proteins, or the like.

[0642] The amount of the metastin receptor contained in the cells containing the metastin receptor or in the mem-

brane fraction is preferably 10^3 to 10^8 molecules per cell, more preferably 10^5 to 10^7 molecules per cell. As the amount of expression increases, the ligand binding activity per unit of membrane fraction (specific activity) increases so that not only the highly sensitive screening system can be constructed but also large quantities of samples can be assayed with the same lot.

[0643] To perform the aforesaid methods (i) through (iii) for screening the substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor, an appropriate fraction of the metastin receptor and labeled metastin, etc. are used. The fraction of the metastin receptor is preferably a fraction of a naturally occurring type metastin receptor or a fraction of a recombinant type metastin receptor having an equivalent activity. Herein, the term equivalent activity is intended to mean the ligand binding activity, etc. that is equivalent.

[0644] As the labeled metastin, there may be used a labeled ligand, a labeled ligand analog compound, etc. For example, metastin labeled with [^3H], [^{125}I], [^{14}C], [^{35}S], etc. can be utilized.

[0645] Specifically, the substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor is screened by the following procedures. First, a receptor preparation is prepared by suspending a cell containing the metastin receptor or a membrane fraction of the cell in a buffer appropriate for use in the screening method. Any buffer can be used so long as it does not interfere the metastin-metastin receptor binding, including a phosphate buffer or a Tris-HCl buffer, having pH of 4 to 10 (preferably pH of 6 to 8), etc. For the purpose of minimizing non-specific binding, a surfactant such as CHAPS, Tween-80™ (Kao-Atlas Inc.), digitonin, deoxycholate, etc., may optionally be added to the buffer. Further for the purpose of suppressing the degradation of the metastin receptor or metastin with a protease, a protease inhibitor such as PMSF, leupeptin, E-64 (manufactured by Peptide Institute, Inc.), pepstatin, etc. may also be added. A given amount (5,000 cpm to 500,000 cpm) of the labeled metastin is added to 0.01 ml to 10 ml of the receptor solution, in which 10^{-4} M to 10^{-1} M of a test compound is co-present. To determine the amount of non-specific binding (NSB), a reaction tube charged with unlabeled metastin in large excess is also provided. The reaction is carried out at approximately 0° C. to 50° C., preferably 4° C. to 37° C. for 20 minutes to 24 hours, preferably 30 minutes to 3 hours. After completion of the reaction, the reaction mixture is filtrated through glass fiber filter paper, etc. and washed with an appropriate volume of the same buffer. The residual radioactivity on the glass fiber filter paper is then measured by means of a liquid scintillation counter or γ -counter. When nonspecific binding (NSB) is subtracted from the count (B0) where any antagonizing substance is absent and the resulting count (B0 minus NSB) is made 100%, the test compound showing the specific binding amount (B minus NSB) of, e.g., 50% or less may be selected as a candidate substance.

[0646] The methods (iv) to (vii) described above for screening the substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor can be carried out as follows. For example, the cell stimulating activity mediated by the metastin receptor may be determined by a publicly known method, or using an assay kit commercially available. Specifically, the cells containing the metastin receptor are first cultured on a multiwell plate, etc. Prior to screening,

the medium is replaced with fresh medium or with an appropriate non-cytotoxic buffer, followed by incubation for a given period of time in the presence of a test compound, etc. Subsequently, the cells are extracted or the supernatant is recovered and the resulting product is quantified by appropriate procedures. Where it is difficult to detect the production of the cell-stimulating activity indicator (e.g., Ca^{2+} arachidonic acid, cAMP etc.) due to a degrading enzyme contained in the cells, an inhibitor against such as a degrading enzyme may be added prior to the assay. For detecting the activity such as the cAMP production suppression, the baseline production in the cells is increased by forskolin or the like and the suppressing effect on the increased baseline production can be detected.

[0647] For screening through the assay of the cell stimulating activity, appropriate cells, in which an appropriate metastin receptor is expressed, are required. The cells, in which the metastin receptor of the present invention is expressed, are preferably the aforesaid cell line in which the recombinant type metastin receptor is expressed, etc.

[0648] Examples of the test compounds include peptides, proteins, non-peptide compounds, synthetic compounds, fermentation products, cell extracts, plant extracts, animal tissue extracts, seminal plasma, etc. These compounds may be novel compounds or publicly known compounds.

[0649] The test compound may be in the form of salts. As salts of the test compound, there may be used salts with physiologically acceptable acids (e.g., inorganic acids, etc.) or bases (e.g., organic acids, etc.), preferably in the form of physiologically acceptable acid addition salts. Examples of such salts are salts with inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, etc.), salts with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid, etc.) and the like.

[0650] The test compound, which is preferably used is a compound designed to bind to the ligand-binding pocket, based on the atomic coordinate and the position of the ligand-binding pocket in the active site of metastin receptor. The atomic coordinate and the position of the ligand-binding pocket in the active site of metastin receptor can be determined by publicly known methods or modifications thereof.

[0651] The kit for screening a substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor comprises the metastin receptor, cells containing the metastin receptor or a membrane fraction of the cells, and/or metastin.

[0652] Examples of the screening kit of the present invention are given below:

1. Reagent for Screening

(1) Assay Buffer and Wash Buffer

[0653] Hanks' Balanced Salt Solution (manufactured by Gibco Co.) supplemented with 0.05% bovine serum albumin (Sigma Co.).

[0654] The solution is sterilized by filtration through a 0.45 μm filter and stored at 4° C.; alternatively, the solution may be prepared at use.

(2) Metastin Receptor Preparation

[0655] CHO cells on which the metastin receptor has been expressed are subcultured in a 12-well plate at the rate of 5×10^5 cells/well and then cultured at 37° C. under 5% CO₂ and 95% air for 2 days.

(3) Labeled Ligand

[0656] Metastin labeled with commercially available [³H], [¹²⁵I], [¹⁴C], [³⁵S], etc. is dissolved in a suitable solvent or buffer. The solution is stored at 4° C. or -20° C., which is diluted to 1 μM with an assay buffer at use.

(4) Standard Ligand Solution

[0657] Metastin is dissolved in PBS supplemented with 0.1% bovine serum albumin (manufactured by Sigma, Inc.) in a concentration of 1 mM, and the solution is stored at -20° C.

2. Assay Method

[0658] (1) Cells are cultured in a 12-well tissue culture plate to express the metastin receptor. After washing the cells twice with 1 ml of the assay buffer, 490 μl of the assay buffer is added to each well.

[0659] (2) After 5 μl of a test compound solution of 10^{-3} to 10^{-10} M is added, 5 [l of labeled metastin is added to the system followed by reacting at room temperature for an hour. To determine the amount of the non-specific binding, the ligand of 10^{-3} M is added in an amount of 5 μl, instead of the test compound.

[0660] (3) The reaction mixture is removed and washed 3 times with 1 ml each of the wash buffer. The labeled metastin bound to the cells is dissolved in 0.2N NaOH-1% SDS and mixed with 4 ml of a liquid scintillator A (manufactured by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[0661] (4) Radioactivity is measured using a liquid scintillation counter (manufactured by Beckmann) and PMB (percent of the maximum binding) is calculated in accordance with the following equation 1:

$$PMB = \frac{(B - NSB)}{(B0 - NSB)} \times 100$$

wherein:

[0662] PMB: percent of the maximum binding

[0663] B: value when a sample is added

[0664] NSB: non-specific binding

[0665] B0: maximum binding

[0666] The substance obtained by the screening method or the screening kit of the present invention is the substance that alters the binding property of metastin to the metastin receptor (promotes or inhibits the binding). Specifically, it is the substance having the cell stimulating activity mediated by the metastin receptor (a so-called agonist for the metastin receptor), or the compound having no such cell stimulating activity (a so-called antagonist to the metastin receptor).

[0667] The substance is a compound selected from the test compounds described above. These compounds may be novel or publicly known compounds.

[0668] In order to evaluate whether the compound is either an agonist or an antagonist of the metastin receptor, it is determined by (1) or (2) below.

[0669] (1) According to the screening methods (i) to (iii), the binding assay is carried out to obtain a substance that alters the binding property of metastin and the metastin receptor (especially, a substance that inhibits the binding). It is then determined if the substance has the above cell-stimulating activity mediated by the metastin receptor. The substance having the cell-stimulating activity is an agonist for the metastin receptor, whereas the substance having no such an activity is an antagonist to the metastin receptor.

[0670] (2) (a) A test compound is brought in contact with a cell containing the metastin receptor, whereby the afore-said cell-stimulating activity mediated by the metastin receptor is assayed. The substance having the cell-stimulating activity is an agonist for the metastin receptor.

[0671] (b) The cell-stimulating activity mediated by the metastin receptor is assayed in the case where a compound that activates the metastin receptor (e.g., metastin, etc.) is brought in contact with cells containing the metastin receptor and in the case where a compound that activates the metastin receptor and a test compound are brought in contact with cells containing the metastin receptor, and comparison is made therebetween. The substance that can reduce the cell-stimulating activity induced by the compound that activates the metastin receptor is an antagonist to the metastin receptor.

[0672] Preferably, the cell-stimulating activity as an indicator includes, for example, the activities of promoting intracellular Ca²⁺ release, inhibiting cell proliferation, inhibiting chemotaxis, suppressing tumor growth, increasing blood glucose and promoting pancreatic glucagon secretion.

[0673] As the metastin receptor agonists, there are used, e.g., prodrugs of the metastin derivative (I) of the present invention or its salts, etc.

[0674] The metastin receptor agonists have similar activities to the physiological activities metastin has, and are useful as safe and low-toxic pharmaceuticals as in metastin.

[0675] On the contrary, the metastin receptor antagonists can suppress the physiological activity that metastin has, and are useful as safe and low-toxic pharmaceuticals for suppressing the activity of metastin.

[0676] Accordingly, the metastin receptor agonists are useful as, e.g., hyperglycemic agents, pancreatic glucagon secretagogue agents or urine formation promoting agents. In addition, the metastin receptor agonists are useful as agents for preventing/treating, e.g., obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity.

[0677] Meanwhile, the metastin receptor antagonists are useful as, e.g., hypoglycemic agents, pancreatic glucagon secretion suppressing agents or urine formation suppressing agents. In addition, the metastin receptor antagonists can be used as agents for preventing/treating, e.g., diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, polyuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning.

[0678] Moreover, substances derived from the substance, which can be obtained by using the screening method or screening kit described above, can be used similarly.

[0679] The substance obtained by the screening method above may be in the form of salts. As such salts, there may be used salts with physiologically acceptable acids (e.g., inorganic acids, organic acids, etc.) or bases (e.g., alkali metal salts, etc.), preferably in the form of physiologically acceptable acid addition salts. Examples of such salts are salts with inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, etc.), salts with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid, etc.) and the like.

[0680] When the substance obtained using the screening method of the present invention is used as the therapeutic/preventive agent described above, the substance can be prepared into pharmaceutical preparations in a conventional manner. For example, the substance may be prepared in the form of tablets, capsules, elixir, microcapsules, a sterile solution, a suspension, etc., as in the aforesaid pharmaceutical composition comprising metastin.

[0681] Since the pharmaceutical preparation thus obtained is safe and low toxic, it can be administered to human or warm-blooded animal (e.g., mice, rats, rabbits, sheep, swine, bovine, horses, fowl, cats, dogs, monkeys, chimpanzees, etc.).

[0682] The dose of the substance may vary depending upon its action, target disease, subject to be administered, route of administration, etc. For example, where an agonist for the metastin receptor is orally administered, the compound is administered to adult (as 60 kg body weight) generally in a dose of about 0.1 to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg and more preferably about 1.0 to 20 mg. In parenteral administration, a single dose of the substance may vary depending upon subject to be administered, target disease, etc. When an agonist for the metastin receptor is administered to adult (as 60 kg body weight) in the form of injectable preparation, it is advantageous to administer the compound intravenously in a single dose of about 0.01 to about 30 mg, preferably about 0.1 to about 20 mg and more preferably about 0.1 to about 10 mg a day. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg weight can be administered.

[0683] Next, the method of screening the substance that regulates the expression of metastin and/or the metastin receptor is described.

[0684] Specifically, the screening method of the present invention includes:

[0685] (1) (i) a method of screening a substance that promotes or suppresses the expression of metastin, which comprises assaying the expression level of metastin or the amount of mRNA encoding metastin, in the case wherein a cell or tissue capable of expressing metastin is cultured in the presence or absence of a test compound, and comparing the expression level in the cases; and,

[0686] (2) (i) a method of screening a substance that promotes or suppresses the expression of the metastin receptor, which comprises assaying the expression level of the

metastin receptor or the amount of mRNA encoding metastin, in the case wherein a cell or tissue capable of expressing the metastin receptor is cultured in the presence or absence of a test compound, and comparing the expression level in the cases.

[0687] As the cells or tissues capable of expressing metastin or the metastin receptor, there may be used cells of human and other warm-blooded animals (e.g., guinea pigs, rats, mice, fowl, rabbits, swine, sheep, bovine, monkeys, etc.) (e.g., nerve cell, endocrine cell, neuroendocrine cell, glial cell, β cell of pancreas, bone marrow cell, hepatocyte, splenocyte, mesangial cell, epidermic cell, epithelial cell, endothelial cell, fibroblast, fibrocyte, myocyte, fat cell, immune cell (e.g., macrophage, T cell, B cell, natural killer cell, mast cell, neutrophil, basophil, eosinophil, monocyte, dendritic cell), megakaryocyte, synovial cell, chondrocyte, bone cell, osteoblast, osteoclast, mammary gland cell, or interstitial cell, or the corresponding precursor cell, stem cell, cancer cell, etc.), or any tissues where such cells are present, such as brain or any of brain regions (e.g., olfactory bulb, amygdaloid nucleus, basal ganglia, hippocampus, thalamus, hypothalamus, cerebral cortex, medulla oblongata, cerebellum), spinal cord, pituitary, stomach, pancreas, kidney, liver, gonad, thyroid, gall-bladder, bone marrow, adrenal gland, skin, muscle, lung, gastrointestinal tract (e.g., large intestine and small intestine), blood vessel, heart, thymus, spleen, submandibular gland, peripheral blood, prostate, testis, ovary, placenta, uterus, bone, joint, skeletal muscle, etc. In this case, the cell line and the primary culture system may be used. A transformant transformed with recombinant vector having the DNA encoding the metastin or metastin receptor described above may also be used.

[0688] The cells capable of expressing the metastin or metastin receptor can be incubated in a manner similar to the method for incubation of transformants described above.

[0689] As the test compound, a DNA library may also be used, in addition to the test compounds described above.

[0690] The expression level of the metastin or metastin receptor can be determined by publicly known methods such as immunochemical methods, etc., using an antibody, etc. Alternatively, mRNA encoding metastin can be determined by publicly known methods including Northern hybridization, RT-PCR or TaqMan PCR.

[0691] Comparison of the expression level of mRNA can be made by publicly known methods or a modification thereof, for example, according to the method described in Molecular Cloning, 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989), etc.

[0692] Specifically, the level of mRNA encoding the metastin or metastin receptor is determined by contacting RNA extracted from cells according to publicly known methods with the DNA encoding the metastin or metastin receptor or a part thereof or the antisense polynucleotide of the present invention, and assaying the level of mRNA bound to the DNA encoding the metastin or metastin receptor or a part thereof or the antisense polynucleotide of the present invention. The level of mRNA bound to the DNA encoding the metastin or metastin receptor or a part thereof or the antisense polynucleotide of the present invention can be readily assayed by labeling the DNA encoding the metastin or metastin receptor or a part thereof or the anti-

sense polynucleotide of the present invention with, e.g., a radioisotope, a dye, etc. Examples of the radioisotope are ^{32}P , ^3H , etc. Examples of the dye used are fluorescent dyes such as fluorescein, FAM (manufactured by Biosystems, Inc.), JOE (manufactured by PE Biosystems, Inc.), TAMRA (manufactured by PE Biosystems, Inc.), ROX (manufactured by PE Biosystems, Inc.), Cy5 (manufactured by Amersham), Cy3 (manufactured by Amersham), etc.

[0693] The level of mRNA can also be determined by converting RNA extracted from cells into cDNA by a reverse transcriptase, amplifying the cDNA by PCR using the DNA encoding the metastin or metastin receptor or a part thereof or antisense polynucleotide of the present invention as a primer, and assaying the level of the cDNA amplified.

[0694] As described above, the test compound that increases the level of mRNA encoding the metastin or metastin receptor can be selected as a substance having the activity of promoting the expression of the metastin or metastin receptor. Also, the test compound that lowers the level of mRNA encoding the metastin or metastin receptor can be selected as a substance having the activity of suppressing the expression of the metastin or metastin receptor.

[0695] The present invention further provides:

[0696] (ii) a method of screening a substance that promotes or inhibits a promoter activity, which comprises assaying the reporter activity in the case wherein a transformant transformed by a recombinant DNA ligated with a reporter gene downstream the promoter region or enhancer region of a gene encoding the metastin or metastin receptor is cultured in the presence or absence of a test compound, and comparing the activity in each case.

[0697] As the reporter gene, there may be employed, e.g., lacZ (β -galactosidase gene), chloramphenicol acetyltransferase (CAT), luciferase, growth factor, β -glucuronidase, alkaline phosphatase, green fluorescent protein (GFP), β -lactamase, etc.

[0698] By determining the level of the reporter gene product (e.g., mRNA, protein) using publicly known methods, the test compound that increases the level of the reporter gene product can be selected as the compound having the activity of regulating (especially promoting) the promoter or enhancer activity of the peptide of the present invention, i.e., the substance having the activity of promoting the expression of the metastin or metastin receptor. To the contrary, the test compound that decreases the level of the reporter gene product can be selected as the compound having the activity of regulating (especially suppressing) the promoter or enhancer activity of the metastin or metastin receptor, i.e., the substance having the activity of suppressing the expression of the metastin or metastin receptor.

[0699] As the test compounds, those described above are employed.

[0700] The transformants can be incubated as given for the transformants described above.

[0701] Construction of vectors for the reporter genes and assay can be performed according to publicly known techniques (e.g., Molecular Biotechnology, 13, 29-43, 1999).

[0702] The substance having the activity of promoting the expression of the metastin or metastin receptor has an effect

of promoting the physiological activity that metastin has, and is thus useful as safe and low-toxic pharmaceuticals similarly to metastin.

[0703] To the contrary, the substance having the activity of suppressing the expression of the metastin or metastin receptor can suppress the physiological activity that metastin has, and is thus useful as safe and low-toxic pharmaceuticals, which suppress the activity of metastin.

[0704] Therefore, the substance that promotes the expression of the metastin or metastin receptor is useful as, e.g., a hyperglycemic agent, a pancreatic glucagon secretagogue agent or a urine formation promoting agent. In addition, the substance that promotes the expression of the metastin or metastin receptor is useful as an agent for preventing/treating, e.g., obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity.

[0705] On the other hand, the substance that suppresses the expression of the metastin or metastin receptor is useful as, e.g., a hypoglycemic agent, a pancreatic glucagon secretion suppressing agent or a urine formation suppressing agent. In addition, the substance that suppresses the expression of the metastin or metastin receptor is useful as an agent for preventing/treating, e.g., diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, pollakiuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning.

[0706] The substances obtained by the screening method of the present invention include peptides, proteins, non-peptide compounds, synthetic compounds, fermentation products, cell extracts, plant extracts, animal tissue extracts, plasma, etc. The salts of said compounds are the same as the salts of metastin described above.

[0707] Moreover, substances derived from the substance obtained by using the screening method or screening kit described above can be used similarly.

[0708] When the substance obtained using the screening method of the present invention is used as the therapeutic/preventive agent described above, the substance can be prepared into pharmaceutical preparations in a conventional manner. For example, the substance may be prepared in the form of tablets, capsules, elixir, microcapsules, a sterile solution, a suspension, etc., as in the pharmaceutical composition comprising metastin described above.

[0709] Since the pharmaceutical preparation thus obtained is safe and low toxic, it can be administered to human or warm-blood animal (e.g., mouse, rat, rabbit, sheep, swine, bovine, horse, fowl, cat, dog, monkey, chimpanzee, etc.).

[0710] A dose of the substance may vary depending on its action, target disease, subject to be administered, route for administration, etc.; when a substance that promotes the expression of metastin is orally administered, the substance is administered to adult (as 60 kg body weight) normally in a daily dose of about 0.1 to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg and more preferably about 1.0 to 20 mg. In parenteral

administration, a single dose of the compound varies depending on subject to be administered, target disease, etc. but when a substance that promotes the expression of metastin is administered to adult (as 60 kg body weight) in the form of injectable preparation, it is advantageous to administer the substance intravenously in a daily dose of about 0.01 to about 30 mg, preferably about 0.1 to about 20 mg and more preferably about 0.1 to about 10 mg. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg weight can be administered.

(7) DNA Transgenic Animal

[0711] The present invention provides a non-human mammal bearing DNA encoding the metastin or metastin receptor, which is exogenous (hereinafter abbreviated as the exogenous DNA of the present invention) or its variant DNA (sometimes briefly referred to as the exogenous variant DNA of the present invention).

[0712] That is, the present invention provides:

[0713] (i) A non-human mammal bearing the exogenous DNA of the present invention or its variant DNA;

[0714] (ii) The mammal according to (i), wherein the non-human mammal is a rodent;

[0715] (iii) The mammal according to (ii), wherein the rodent is mouse or rat; and,

[0716] (iv) A recombinant vector containing the exogenous DNA of the present invention or its variant DNA and capable of expressing in a mammal; etc.

[0717] The non-human mammal bearing the exogenous DNA of the present invention or its variant DNA (hereinafter simply referred to as the DNA transgenic animal of the present invention) can be prepared by transfecting a desired DNA into an unfertilized egg, a fertilized egg, a spermatozoon, a germinal cell containing a primordial germinal cell thereof, or the like, preferably in the embryogenic stage in the development of a non-human mammal (more preferably in the single cell or fertilized cell stage and generally before the 8-cell phase), by standard means, such as the calcium phosphate method, the electric pulse method, the lipofection method, the agglutination method, the microinjection method, the particle gun method, the DEAE-dextran method, etc. Also, it is possible to transfect the exogenous DNA of the present invention into a somatic cell, a living organ, a tissue cell, or the like by the DNA transfection methods, and utilize the transformant for cell culture, tissue culture, etc. In addition, these cells may be fused with the above-described germinal cell by a publicly known cell fusion method to prepare the DNA transgenic animal of the present invention.

[0718] Examples of the non-human mammal that can be used include bovine, swine, sheep, goat, rabbits, dogs, cats, guinea pigs, hamsters, mice, rats, etc. Above all, preferred are rodents, especially mice (e.g., C57BL/6 strain, DBA2 strain, etc. for a pure line and for a cross line, B6C3F₁ strain, BDF₁ strain B6D2F₁ strain, BALB/c strain, ICR strain, etc.), rats (Wistar, SD, etc.) or the like, since they are relatively short in ontogeny and life cycle from a standpoint of creating model animals for human disease.

[0719] "Mammals" in a recombinant vector that can be expressed in the mammals include the aforesaid non-human mammals, human, etc.

[0720] The exogenous DNA of the present invention refers to the DNA of the present invention that is once isolated/extracted from mammals, not the metastin or metastin receptor (hereinafter briefly referred to as the DNA of the present invention) inherently possessed by the non-human mammals.

[0721] The mutant DNA of the present invention includes mutants resulting from variation (e.g., mutation, etc.) in the base sequence of the original DNA of the present invention, specifically DNAs resulting from base addition, deletion, substitution with other bases, etc. and further including abnormal DNA.

[0722] The abnormal DNA is intended to mean the DNA that expresses the metastin or metastin receptor which is abnormal and exemplified by a DNA, etc. that expresses a peptide for suppressing the function of the metastin or metastin receptor which is normal.

[0723] The exogenous DNA of the present invention may be any one of those derived from a mammal of the same species as, or a different species from, the mammal as the target animal. In transfecting the DNA of the present invention into the target animal, it is generally advantageous to use the DNA as a DNA construct in which the DNA is ligated downstream a promoter capable of expressing the DNA in the target animal. For example, in the case of transfecting the human DNA of the present invention, a DNA transgenic mammal that expresses the DNA of the present invention to a high level, can be prepared by microinjecting a DNA construct (e.g., vector, etc.) ligated with the human DNA of the present invention into a fertilized egg of the target non-human mammal downstream various promoters which are capable of expressing the DNA derived from various mammals (e.g., rabbits, dogs, cats, guinea pigs, hamsters, rats, mice, etc.) bearing the DNA of the present invention highly homologous to the human DNA.

[0724] As expression vectors for the metastin or metastin receptor, there are *Escherichia coli*-derived plasmids, *Bacillus subtilis*-derived plasmids, yeast-derived plasmids, bacteriophages such as ϕ phage, retroviruses such as Moloney leukemia virus, etc., and animal viruses such as vaccinia virus, baculovirus, etc. Of these vectors, *Escherichia coli*-derived plasmids, *Bacillus subtilis*-derived plasmids, or yeast-derived plasmids, etc. are preferably used.

[0725] Examples of these promoters for regulating the DNA expression described above include promoters for DNA derived from viruses (e.g., simian virus, cytomegalovirus, Moloney leukemia virus, JC virus, breast cancer virus, poliovirus, etc.), and promoters derived from various mammals (human, rabbits, dogs, cats, guinea pigs, hamsters, rats, mice, etc.), for example, promoters of albumin, insulin II, uroplakin II, elastase, erythropoietin, endothelin, muscular creatine kinase, glial fibrillary acidic protein, glutathione S-transferase, platelet-derived growth factor β , keratins K1, K10 and K14, collagen types I and II, cyclic AMP-dependent protein kinase β 1 subunit, dystrophin, tartarate-resistant alkaline phosphatase, atrial natriuretic factor, endothelial receptor tyrosine kinase (generally abbreviated as Tie2), sodium-potassium adenosine triphosphorylase (Na,K-ATPase), neurofilament light chain, metallothioneins I and IIA, metalloproteinase I tissue inhibitor, MHC class I antigen (H-2L), H-ras, renin, dopamine β -hydroxylase, thyroid per-

oxidase (TPO), protein chain elongation factor 1 α (EF-1 α), β actin, α and β myosin heavy chains, myosin light chains 1 and 2, myelin base protein, thyroglobulins, Thy-1, immunoglobulins, H-chain variable region (VNP), serum amyloid component P₂, myoglobin, troponin C, smooth muscle α actin, preproencephalin A, vasopressin, etc. Among them, cytomegalovirus promoters, human peptide elongation factor 1 α (EF-1 α) promoters, human and fowl β actin promoters, etc., which are capable of high expression in the whole body are preferred.

[0726] Preferably, the vectors described above have a sequence that terminates the transcription of the desired messenger RNA in the DNA transgenic animal (generally termed a terminator); for example, a sequence of each DNA derived from viruses and various mammals, and SV40 terminator of the simian virus and the like are preferably used.

[0727] In addition, for the purpose of enhancing the expression of the desired exogenous DNA to a higher level, the splicing signal and enhancer region of each DNA, a portion of the intron of an eukaryotic DNA may also be ligated at the 5' upstream of the promoter region, or between the promoter region and the translational region, or at the 3' downstream of the translational region, depending upon purposes.

[0728] The translational region for the normal metastin or metastin receptor can be obtained using as a starting material the entire genomic DNA or its portion of liver, kidney, thyroid cell or fibroblast origin from human or various mammals (e.g., rabbits, dogs, cats, guinea pigs, hamsters, rats, mice, etc.) or of various commercially available genomic DNA libraries, or using cDNA prepared by a publicly known method from RNA of liver, kidney, thyroid cell or fibroblast origin as a starting material. Also, an exogenous abnormal DNA can produce the translational region through variation of the translational region of normal peptide obtained from the cells or tissues described above by point mutagenesis.

[0729] The translational region can be prepared by a conventional DNA engineering technique, in which the DNA is ligated downstream the aforesaid promoter and if desired, upstream the translation termination site, as a DNA construct capable of being expressed in the transgenic animal.

[0730] The exogenous DNA of the present invention is transfected at the fertilized egg cell stage in a manner such that the DNA is certainly present in all the germinal cells and somatic cells of the target mammal. The fact that the exogenous DNA of the present invention is present in the germinal cells of the animal prepared by DNA transfection means that all offspring of the prepared animal will maintain the exogenous DNA of the present invention in all of the germinal cells and somatic cells thereof. The offspring of the animal that inherits the exogenous DNA of the present invention also have the exogenous DNA of the present invention in all of the germinal cells and somatic cells thereof.

[0731] The non-human mammal in which the normal exogenous DNA of the present invention has been transfected can be passaged as the DNA-bearing animal under ordinary rearing environment, by confirming that the exogenous DNA is stably retained by crossing.

[0732] By the transfection of the exogenous DNA of the present invention at the fertilized egg cell stage, the DNA is retained to be excess in all of the germinal and somatic cells. The fact that the exogenous DNA of the present invention is excessively present in the germinal cells of the prepared animal after transfection means that the DNA of the present invention is excessively present in all of the germinal cells and somatic cells thereof. The offspring of the animal that inherits the exogenous DNA of the present invention have excessively the DNA of the present invention in all of the germinal cells and somatic cells thereof.

[0733] It is possible to obtain homozygotic animals having the transfected DNA in both homologous chromosomes and breed male and female of the animal so that all the progeny have this DNA in excess.

[0734] In a non-human mammal bearing the normal DNA of the present invention, the normal DNA of the present invention has expressed at a high level, and may eventually develop hyperfunction in the function of the metastin or metastin receptor by accelerating the function of endogenous normal DNA. Therefore, the animal can be utilized as a pathologic model animal for such a disease. For example, using the normal DNA transgenic animal of the present invention, it is possible to elucidate the mechanism of hyperfunction in the function of the metastin or metastin receptor and the pathological mechanism of the disease associated with the metastin or metastin receptor and to investigate how to treat these diseases.

[0735] Furthermore, a mammal transfected with the exogenous normal DNA of the present invention exhibits a symptom of increasing the metastin or metastin receptor liberated. Thus, the animal is usable for screening test of prophylactic/therapeutic agents for diseases associated with the metastin or metastin receptor.

[0736] On the other hand, a non-human mammal having the exogenous abnormal DNA of the present invention can be passaged under normal breeding conditions as the DNA-bearing animal by confirming stable retention of the exogenous DNA via crossing. Furthermore, the exogenous DNA of interest can be utilized as a starting material by inserting the DNA into the plasmid described above. The DNA construct with a promoter can be prepared by conventional DNA engineering techniques. The transfection of the abnormal DNA of the present invention at the fertilized egg cell stage is preserved to be present in all of the germinal and somatic cells of the target mammal. The fact that the abnormal DNA of the present invention is present in the germinal cells of the animal after DNA transfection means that all of the offspring of the prepared animal have the abnormal DNA of the present invention in all of the germinal and somatic cells. Such an offspring that passaged the exogenous DNA of the present invention will have the abnormal DNA of the present invention in all of the germinal and somatic cells. A homozygous animal having the introduced DNA on both of homologous chromosomes can be acquired, and by crossing these male and female animals, all the offspring can be bred to retain the DNA.

[0737] In a non-human mammal bearing the abnormal DNA of the present invention, the abnormal DNA of the present invention has expressed to a high level, and may eventually develop the function inactive type inadaptability to metastin or metastin receptor by inhibiting the functions

of endogenous normal DNA. Therefore, the animal can be utilized as a pathologic model animal for such a disease. For example, using the abnormal DNA transgenic animal of the present invention, it is possible to elucidate the mechanism of the function inactive type inadaptability to the peptide of the present invention and the pathological mechanism and to investigate how to treat the disease.

[0738] More specifically, the transgenic animal of the present invention expressing the abnormal DNA of the present invention at a high level is expected to serve as an experimental model to elucidate the mechanism of the functional inhibition (dominant negative effect) of normal metastin or normal metastin receptor by the abnormal metastin or abnormal metastin receptor in the function inactive type inadaptability of the AEORIN or metastin receptor.

[0739] Since a mammal bearing the abnormal exogenous DNA of the present invention shows a symptom of increasing the metastin or metastin receptor of the present invention which is liberated, the animal can be utilized also in the screening test of agents for treating the function inactive type inadaptability of the metastin or metastin receptor (e.g., obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity).

[0740] Other potential applications of two kinds of the DNA transgenic animals of the present invention described above further include:

[0741] (1) Use as a cell source for tissue culture;

[0742] (2) Elucidation of the relation to a peptide that is specifically expressed or activated by the metastin or metastin receptor, by direct analysis of DNA or RNA in tissues of the DNA transgenic animal of the present invention or by analysis of the peptide tissues expressed by the DNA;

[0743] (3) Research on the function of cells derived from tissues that are usually cultured only with difficulty, using cells in tissues bearing the DNA cultured by a standard tissue culture technique;

[0744] (4) Screening a drug that enhances the functions of cells using the cells described in (1) above; and,

[0745] (5) Isolation and purification of the variant peptide of the present invention and preparation of an antibody thereto; etc.

[0746] Furthermore, clinical conditions of a disease associated with the metastin or metastin receptor, including the function inactive type inadaptability to the metastin or metastin receptor can be determined by using the DNA transgenic animal of the present invention. Also, pathological findings on each organ in a disease model associated with the metastin or metastin receptor can be obtained in more detail, leading to the development of a new method for treatment as well as the research and therapy of any secondary diseases associated with the disease.

[0747] It is also possible to obtain a free DNA-transfected cell by withdrawing each organ from the DNA transgenic animal of the present invention, mincing the organ and degrading with a proteinase such as trypsin, etc., followed

by establishing the line of culturing or cultured cells. Furthermore, the DNA transgenic animal of the present invention can serve to identify cells capable of producing the metastin or metastin receptor, and to study in association with apoptosis, differentiation or propagation or on the mechanism of signal transduction in these properties to inspect any abnormality therein. Accordingly, the DNA transgenic animal can provide an effective research material for the metastin or metastin receptor and for investigation of the function and effect thereof.

[0748] To develop a drug for the treatment of diseases associated with the metastin or metastin receptor, including the function inactive type inadaptability to the metastin or metastin receptor, using the DNA transgenic animal of the present invention, an effective and rapid method for screening can be provided by using the method for inspection and the method for quantification, etc. described above. It is also possible to investigate and develop a method for DNA therapy for the treatment of diseases associated with the metastin or metastin receptor, using the DNA transgenic animal of the present invention or a vector capable of expressing the exogenous DNA of the present invention.

(8) Knockout Animal

[0749] The present invention provides a non-human mammal embryonic stem cell bearing the DNA encoding the metastin or metastin receptor (hereinafter briefly referred to as the DNA of the present invention) inactivated and a non-human mammal deficient in expressing the DNA of the present invention.

[0750] Thus, the present invention provides:

[0751] (i) A non-human mammal embryonic stem cell in which the DNA of the present invention is inactivated;

[0752] (ii) The embryonic stem cell according to (i), wherein the DNA is inactivated by introducing a reporter gene (e.g., β -galactosidase gene derived from *Escherichia coli*);

[0753] (iii) The embryonic stem cell according to (i), which is resistant to neomycin;

[0754] (iv) The embryonic stem cell according to (i), wherein the non-human mammal is a rodent;

[0755] (v) The embryonic stem cell according to (iv), wherein the rodent is mouse;

[0756] (vi) A non-human mammal deficient in expressing the DNA of the present invention, wherein the DNA is inactivated;

[0757] (vii) The non-human mammal according to (vi), wherein the DNA is inactivated by inserting a reporter gene (e.g., β -galactosidase derived from *Escherichia coli*) therein and the reporter gene is capable of being expressed under control of a promoter for the DNA of the present invention;

[0758] (viii) The non-human mammal according to (vi), which is a rodent;

[0759] (ix) The non-human mammal according to (viii), wherein the rodent is mouse; and,

[0760] (x) A method of screening a compound that promotes or inhibits (preferably inhibits) the promoter activity to the DNA of the present invention, which comprises

administering a test compound to the mammal of (vii) and detecting expression of the reporter gene.

[0761] The non-human mammal embryonic stem cell in which the DNA of the present invention is inactivated refers to a non-human mammal embryonic stem cell that suppresses the ability of the non-human mammal to express the DNA by artificially mutating the DNA of the present invention, or the DNA has no substantial ability to express the peptide of the present invention (hereinafter sometimes referred to as the knockout DNA of the present invention) by substantially inactivating the activities of the peptide of the present invention encoded by the DNA (hereinafter briefly referred to as ES cell).

[0762] As the non-human mammal, the same examples as described above apply.

[0763] Techniques for artificially mutating the DNA of the present invention include deletion of a part or all of the DNA sequence and insertion of or substitution with other DNA, by genetic engineering. By these variations, the knockout DNA of the present invention may be prepared, for example, by shifting the reading frame of a codon or by disrupting the function of a promoter or exon.

[0764] Specifically, the non-human mammal embryonic stem cell in which the DNA of the present invention is inactivated (hereinafter merely referred to as the ES cell with the DNA of the present invention inactivated or the knockout ES cell of the present invention) can be obtained by, for example, isolating the DNA of the present invention that the desired non-human mammal possesses, inserting a DNA fragment having a DNA sequence constructed by inserting a drug resistant gene such as a neomycin resistant gene or a hygromycin resistant gene, or a reporter gene such as lacZ (β -galactosidase gene) or cat (chloramphenicol acetyltransferase gene), etc. into its exon site thereby to disable the functions of exon, or integrating to a chromosome of the target animal by, e.g., homologous recombination, a DNA sequence that terminates gene transcription (e.g., polyA additional signal, etc.) in the intron between exons, thus inhibiting the synthesis of complete messenger RNA and eventually destroying the gene (hereinafter simply referred to as a targeting vector). The thus-obtained ES cells to the southern hybridization analysis with a DNA sequence on or near the DNA of the present invention as a probe, or to PCR analysis with a DNA sequence on the targeting vector and another DNA sequence near the DNA of the present invention which is not included in the targeting vector as primers, to select the knockout ES cell of the present invention.

[0765] The parent ES cells to inactivate the DNA of the present invention by homologous recombination, etc. may be of a strain already established as described above, or may originally be established in accordance with a modification of the known method by Evans and Kaufman described above. For example, in the case of mouse ES cells, currently it is common practice to use ES cells of the 129 strain. However, since their immunological background is obscure, the C57BL/6 mouse or the BDF₁ mouse (F₁ between C57BL/6 and DBA/2), wherein the low ovum availability per C57BL/6 in the C57BL/6 mouse has been improved by crossing with DBA/2, may be preferably used, instead of obtaining a pure line of ES cells with the clear immunological genetic background and for other purposes. The

BDF₁ mouse is advantageous in that, when a pathologic model mouse is generated using ES cells obtained therefrom, the genetic background can be changed to that of the C57BL/6 mouse by back-crossing with the C57BL/6 mouse, since its background is of the C57BL/6 mouse, as well as being advantageous in that ovum availability per animal is high and ova are robust.

[0766] In establishing ES cells, blastocytes at 3.5 days after fertilization are commonly used. Embryos are preferably collected at the 8-cell stage, after culturing until the blastocyte stage; the embryos are used to efficiently obtain a large number of early stage embryos.

[0767] Although the ES cells used may be of either sex, male ES cells are generally more convenient for generation of a germ cell line chimera. It is also desirable that sexes are identified as soon as possible to save painstaking incubation time.

[0768] Methods for sex identification of the ES cell include the method in which a gene in the sex-determining region on the Y-chromosome is amplified by the PCR process and detected. When this method is used, one colony of ES cells (about 50 cells) is sufficient for sex-determination analysis, which karyotype analysis, for example G-banding method, requires about 10⁶ cells; therefore, the first selection of ES cells at the early stage of culture can be based on sex identification, and male cells can be selected early, which saves a significant amount of time at the early stage of incubation.

[0769] Also, second selection can be achieved by, for example, confirmation of the number of chromosomes by the G-banding method. It is usually desirable that the chromosome number of the obtained ES cells be 100% of the normal number. However, when it is difficult to obtain the cells having the normal number of chromosomes due to physical operations, etc. in the cell establishment, it is desirable that the ES cell is again cloned to a normal cell (e.g., in a mouse cell having the number of chromosomes being 2n=40) after knockout of the gene of the ES cells.

[0770] Although the embryonic stem cell line thus obtained shows a very high growth potential, it must be subcultured with great care, since it tends to lose its ontogenic capability. For example, the embryonic stem cell line is cultured at about 37° C. in a carbon dioxide incubator (preferably 5% carbon dioxide and 95% air, or 5% oxygen, 5% carbon dioxide and 90% air) in the presence of LIF (1 to 10000 U/ml) on appropriate feeder cells such as STO fibroblasts, treated with a trypsin/EDTA solution (normally 0.001 to 0.5% trypsin/0.1 to about 5 mM EDTA, preferably about 0.1% trypsin/1 mM EDTA) at the time of passage to obtain separate single cells, which are then plated on freshly prepared feeder cells. This passage is normally conducted every 1 to 3 days; it is desirable that cells be observed at the passage and cells found to be morphologically abnormal in culture, if any, be abandoned.

[0771] Where ES cells are allowed to reach a high density in mono-layers or to form cell aggregates in suspension under appropriate conditions, it is possible to differentiate the ES cells to various cell types, for example, parietal and visceral muscles, cardiac muscle or the like [M. J. Evans and M. H. Kaufman, *Nature*, 292, 154, 1981; G. R. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 7634, 1981; T. C. Doetschman

et al., *Journal of Embryology Experimental Morphology*, 87, 27, 1985]. The cells deficient in expression of the DNA of the present invention, which are obtained from the differentiated ES cells of the present invention, are useful for cytological study of the peptide of the present invention or the receptor protein of the present invention in vitro.

[0772] The non-human mammal deficient in expression of the DNA of the present invention can be identified from a normal animal by measuring the mRNA level in the subject animal by a publicly known method, and indirectly comparing the degrees of expression.

[0773] As the non-human mammal, the same examples given above apply.

[0774] With respect to the non-human mammal deficient in expression of the DNA of the present invention, the DNA of the present invention can be knockout by transfecting a targeting vector, prepared as described above, to mouse embryonic stem cells or mouse oocytes, and conducting homologous recombination in which a targeting vector DNA sequence, wherein the DNA of the present invention is inactivated by the transfection, is replaced with the DNA of the present invention on a chromosome of a mouse embryonic stem cell or mouse embryo.

[0775] The knockout cells with the disrupted DNA of the present invention can be identified by the southern hybridization analysis using as a probe a DNA fragment on or near the DNA of the present invention, or by the PCR analysis using as primers a DNA sequence on the targeting vector and another DNA sequence at the proximal region of other than the DNA of the present invention derived from mouse used in the targeting vector. When non-human mammal stem cells are used, a cell line wherein the DNA of the present invention is inactivated by homologous recombination is cloned; the resulting clones are injected to, e.g., a non-human mammalian embryo or blastocyst, at an appropriate stage such as the 8-cell stage. The resulting chimeric embryos are transplanted to the uterus of the pseudopregnant non-human mammal. The resulting animal is a chimeric animal constructed with both cells having the normal locus of the DNA of the present invention and those having an artificially mutated locus of the DNA of the present invention.

[0776] When some germ cells of the chimeric animal have a mutated locus of the DNA of the present invention, an individual, which entire tissue is composed of cells having a mutated locus of the DNA of the present invention can be selected from a series of offspring obtained by crossing between such a chimeric animal and a normal animal, e.g., by coat color identification, etc. The individuals thus obtained are normally deficient in heterozygous expression of the peptide of the present invention. The individuals deficient in homozygous expression of the peptide of the present invention can be obtained from offspring of the intercross between those deficient in heterozygous expression of the peptide of the present invention.

[0777] When an oocyte is used, a DNA solution may be injected, e.g., into the pronucleus by microinjection thereby to obtain a transgenic non-human mammal having a targeting vector introduced in its chromosome. From such transgenic non-human mammals, those having a mutation at the locus of the DNA of the present invention can be obtained by selection based on homologous recombination.

[0778] As described above, the individuals in which the DNA of the present invention is knockout permit passage rearing under ordinary rearing conditions, after the individuals obtained by their crossing have proven to have been knockout.

[0779] Furthermore, the genital system may be obtained and retained by conventional methods. That is, by crossing male and female animals each having the inactivated DNA, homozygote animals having the inactivated DNA in both loci can be obtained. The homozygotes thus obtained may be reared so that one normal animal and two or more homozygotes are produced from a mother animal to efficiently obtain such homozygotes. By crossing male and female heterozygotes, homozygotes and heterozygotes having the inactivated DNA are proliferated and passaged.

[0780] The non-human mammal embryonic stem cell, in which the DNA of the present invention is inactivated, is very useful for preparing a non-human mammal deficient in expression of the DNA of the present invention.

[0781] Since the non-human mammal, in which the DNA of the present invention is inactivated, lacks various biological activities derived from the peptide of the present invention, such an animal can be a disease model suspected of inactivated biological activities of the peptide of the present invention and thus, offers an effective study to investigate the causes for and therapy for these diseases.

(8a) Method of Screening the Substance Having Therapeutic/Prophylactic Effects on Diseases Caused by Deficiency, Damages, etc. of the DNA of the Present Invention

[0782] The non-human mammal deficient in expression of the DNA of the present invention can be employed for screening the compound having therapeutic/prophylactic effects on diseases caused by deficiency, damages, etc. of the DNA of the present invention (e.g., obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity).

[0783] That is, the present invention provides a method of screening the substance having therapeutic/prophylactic effects on diseases caused by deficiency, damages, etc. of the DNA of the present invention, which comprises administering a test compound to a non-human mammal deficient in expression of the DNA of the present invention and observing/measuring a change occurred on the animal.

[0784] As the non-human mammal deficient in expression of the DNA of the present invention, which can be employed for the screening method, the same examples as described above apply.

[0785] The same examples of the test compound apply to specific compounds described above.

[0786] Specifically, the non-human mammal deficient in expression of the DNA of the present invention is treated with a test compound, comparison is made with an intact animal for control and a change in each organ, tissue, disease conditions, etc. of the animal is used as an indicator to assess the therapeutic/prophylactic effects of the test compound.

[0787] For treating an animal to be tested with a test compound, for example, oral administration, intravenous

injection, etc. are applied, and the treatment can be appropriately selected depending on conditions of the test animal, properties of the test compound, etc. Furthermore, a dose of the test compound to be administered can be appropriately chosen depending on the administration route, property of the test compound, etc.

[0788] In the screening method, when a test compound is administered to animal under test and disease conditions of the animal are improved by at least about 10%, preferably at least about 30% and more preferably at least about 50%, the test compound can be selected as a substance having therapeutic/prophylactic effects on the diseases described above.

[0789] Specifically, the test compound can be used as, e.g., a hyperglycemic agent, a pancreatic glucagon secretagogue agent or a urine formation promoting agent, and further as an agent for preventing/treating, e.g., obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity.

[0790] In addition, the test compound is applicable also as a test agent to examine the function of increasing blood glucose, promoting pancreatic glucagon secretion or promoting urine formation.

[0791] The substance obtained using the above screening method is a substance selected from the test compounds described above and exhibits therapeutic/prophylactic effects on diseases caused by deficiencies, damages, etc. of the metastatin or metastatin receptor. Therefore, the substance can be employed as a safe and low toxic pharmaceutical such as a prophylactic/therapeutic agent for these diseases.

[0792] Furthermore, substances derived from the substance obtained by the screening described above may be used as well.

[0793] The substance obtained by the screening method above may form salts, and may be used in the form of salts with physiologically acceptable acids (e.g., inorganic acids, organic acids, etc.) or bases (e.g., alkali metal salts), preferably in the form of physiologically acceptable acid addition salts. Examples of such salts are salts with inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, etc.), salts with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid, etc.) and the like.

[0794] A pharmaceutical comprising the substance obtained by the above screening method or salts thereof can be manufactured in a manner similar to the method for preparing the pharmaceutical comprising metastatin described above.

[0795] Since the pharmaceutical preparation thus obtained is safe and low toxic, it can be administered to human or mammal (e.g., rat, mouse, guinea pig, rabbit, sheep, swine, bovine, horse, cat, dog, monkey, etc.).

[0796] A dose of the substance may vary depending upon target disease, subject to be administered, route of administration, etc. For example, where the substance is orally administered, the compound is generally administered to an

adult patient (as 60 kg body weight) in a daily dose of about 0.1 to about 100 mg, preferably about 1.0 to about 50 mg and more preferably about 1.0 to about 20 mg. In parenteral administration, a single dose of the substance may vary depending upon subject to be administered, target disease, etc.; for example, where the substance is administered to an adult patient (as 60 kg body weight) in the form of injectable preparation, it is advantageous to administer the substance intravenously generally in a daily dose of about 0.01 to about 30 mg, preferably about 0.1 to about 20 mg, and more preferably about 0.1 to about 10 mg. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg weight can be administered.

(8b) Method of Screening a Compound that Promotes or Inhibits the Activity of a Promoter for the DNA of the Present Invention

[0797] The present invention provides a method of screening a substance that promote or inhibit the activity of a promoter for the DNA of the present invention, which comprises administering a test compound to a non-human mammal deficient in expression of the DNA of the present invention and detecting the expression of a reporter gene.

[0798] In the screening method described above, an animal in which the DNA of the present invention is inactivated by introducing a reporter gene and the reporter gene is expressed under control of a promoter for the DNA of the present invention is used as the non-human mammal deficient in expression of the DNA of the present invention, which is selected from the aforesaid non-human mammals deficient in expression of the DNA of the present invention.

[0799] The same examples of the test compound apply to specific compounds described above.

[0800] As the reporter gene, the same specific examples apply to this screening method. Preferably, there are used β -galactosidase (*lacZ*), soluble alkaline phosphatase gene, luciferase gene and the like.

[0801] Since the reporter gene is present under control of a promoter for the DNA of the present invention in the non-human mammal deficient in expression of the DNA of the present invention wherein the DNA of the present invention is substituted with the reporter gene, the activity of the promoter can be detected by tracing the expression of a substance encoded by the reporter gene.

[0802] When a part of the DNA region encoding the peptide of the present invention is substituted with, e.g., β -galactosidase gene (*lacZ*) derived from *Escherichia coli*, β -galactosidase is expressed in a tissue where the peptide of the present invention should originally be expressed, instead of the peptide of the present invention. Thus, the state of expression of the peptide of the present invention can be readily observed in vivo of an animal by staining with a reagent, e.g., 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside (X-gal) which is substrate for β -galactosidase. Specifically, a mouse deficient in the peptide of the present invention, or its tissue section is fixed with glutaraldehyde, etc. After washing with phosphate buffered saline (PBS), the system is reacted with a staining solution containing X-gal at room temperature or about 37° C. for approximately 30 minutes to an hour. After the β -galactosidase reaction is terminated by washing the tissue preparation with 1 mM

EDTA/PBS solution, the color formed is observed. Alternatively, mRNA encoding lacZ may be detected in a conventional manner.

[0803] The substance obtained using the screening method described above is a substance that is selected from the test compounds described above and that promotes or inhibits the activity of a promoter for the DNA of the present invention.

[0804] The substance obtained by the screening method above may form salts, and may be used in the form of salts with physiologically acceptable acids (e.g., inorganic acids, etc.) or bases (e.g., organic acids, etc.) or the like, especially in the form of physiologically acceptable acid addition salts. Examples of such salts are salts with inorganic acids (e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, etc.), salts with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid, etc.) and the like.

[0805] The substance promoting the activity of a promoter for the DNA of the present invention can promote the expression of the metastin or metastin receptor and can promote the function of metastin. Thus, the substance is useful as a hyperglycemic agent, a pancreatic glucagon secretagogue agent or a urine formation promoting agent.

[0806] In addition, the substance that promotes the activity of a promoter for the DNA of the present invention is useful as an agent for preventing/treating, e.g., obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity.

[0807] On the other hand, the substance that inhibits the activity of a promoter for the DNA of the present invention inhibits the expression of the metastin or metastin receptor, and is thus useful as, e.g., a hypoglycemic agent, a pancreatic glucagon secretion suppressing agent or a urine formation suppressing agent.

[0808] Furthermore, the substance that inhibits the activity of a promoter for the DNA of the present invention can be used as an agent for preventing/treating, e.g., diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, ketosis, acidosis, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, polyuria, nocturnal enuresis, hyperlipemia, sexual dysfunction, skin disorders, arthropathy, osteopenia, arteriosclerosis, thrombotic disorders, dyspepsia or deficits in memory and learning.

[0809] Moreover, substances derived from the substance obtained by the screening described above may be used as well.

[0810] A pharmaceutical comprising the substance obtained by the above screening method or salts thereof can be manufactured in a manner similar to the method for preparing the pharmaceutical comprising metastin described above.

[0811] Since the pharmaceutical preparation thus obtained is safe and low toxic, it can be administered to human or

mammal (e.g., rat, mouse, guinea pig, rabbit, sheep, swine, bovine, horse, cat, dog, monkey, etc.).

[0812] A dose of the substance may vary depending upon target disease, subject to be administered, route of administration, etc. For example, where a substance that promotes or inhibits the activity of a promoter for the DNA of the present invention is orally administered, the substance is administered to an adult patient (as 60 kg body weight) generally in a daily dose of about 0.1 to about 100 mg, preferably about 1.0 to about 50 mg and more preferably about 1.0 to about 20 mg. In parenteral administration, a single dose of the substance may vary depending upon subject to be administered, target disease, etc. For example, where a substance that promotes or inhibits the activity of a promoter for the DNA of the present invention is administered in the form of injectable preparation, it is advantageous to administer the substance intravenously to an adult patient (as 60 kg body weight) generally in a daily dose of about 0.01 to about 30 mg, preferably about 0.1 to about 20 mg, and more preferably about 0.1 to about 10 mg. For other animal species, the corresponding dose as converted per 60 kg weight can be administered.

[0813] As stated above, the non-human mammal deficient in expression of the DNA of the present invention is extremely useful for screening the compound or its salt that promotes or inhibits the promoter activity to the DNA of the present invention and, can greatly contribute to elucidation of causes for various diseases suspected of deficiency in expression of the DNA of the present invention and for the development of prophylactic/therapeutic agents for these diseases.

[0814] In addition, a so-called transgenic animal (gene transferred animal) can be prepared by using a DNA containing the promoter region of the peptide of the present invention, ligating genes encoding various proteins at the downstream and injecting the same into oocyte of an animal. It is thus possible to synthesize the peptide therein specifically and study its activity in vivo. When an appropriate reporter gene is ligated to the promoter site described above and a cell line that expresses the gene is established, the resulting system can be utilized as the search system for a low molecular compound having the action of specifically promoting or inhibiting the in vivo productivity of the peptide itself of the present invention.

[0815] The present invention will be further described in detail with reference to the following EXAMPLES, PREPARATION EXAMPLES and TEST EXAMPLES but these examples are given by way of illustration, not by way of limitation, and may be varied without departing from the scope of the present invention.

[0816] In the following EXAMPLES, the "room temperature" usually denotes from about 10° C. to about 35° C., % denotes mol/mol % in the case of a yield, denotes volume % in the case of a solvent used in chromatography, and denotes weight % in other cases. In the proton NMR spectrum, protons such as OH and NH protons, etc., which can not be confirmed because they are broad, are not shown in the data.

[0817] The other abbreviations used in the specification mean as follows.

Abbreviation	Description
10? ,CSNH:	The C-terminal CONH ₂ at the 10-position is substituted with —CSNH ₂ .
1? 2,CH ₂ NH:	The —CONH— bond between the 1- and 2-positions is substituted with the —CH ₂ NH— bond.
2?3,CH ₂ NH:	The —CONH— bond between the 2- and 3-positions is substituted with the —CH ₂ NH— bond.
3? 4,CH ₂ NH:	The —CONH— bond between the 3- and 4-positions is substituted with the —CH ₂ NH— bond.
4? 5,CH ₂ NH:	The —CONH— bond between the 4- and 5-positions is substituted with the —CH ₂ NH— bond.
6? 7,CSNH:	The —CONH— bond between the 6- and 7-positions is substituted with the —CSNH— bond.
6? 7,NHCO:	The —CONH— bond between the 6- and 7-positions is substituted with the —NHCO— bond.
6? 7,CH ₂ NH:	The —CONH— bond between the 6- and 7-positions is substituted with the —CH ₂ NH— bond.
7? 8,CH ₂ NH:	The —CONH— bond between the 7- and 8-positions is substituted with the —CH ₂ NH— bond.
8? 9,CH ₂ NH:	The —CONH— bond between the 8- and 9-positions is substituted with the —CH ₂ NH— bond.
9? 10,CH ₂ NH:	The —CONH— bond between the 9- and 10-positions is substituted with the —CH ₂ NH— bond.
Abu:	2-aminobutanoic acid
Ac:	acetyl
AcOEt:	ethyl acetate
AcOH:	acetic acid
Ala(2-Qui):	2-quinolylalanine
Ala(3-Bzt):	3-benzothienylalanine
Arg(Ac):	N ^ω -acetylarginine
Arg(Boc ₂ ,Me):	N ^{ω,ω} -bis-tert-butoxycarbonyl-N ^ω -methylarginine
Arg(Et):	N ^ω -ethylarginine
Arg(Me):	N ^ω -methylarginine
Arg(asyMe ₂):	asymmetric-N ^{ω,ω} -dimethylarginine
Arg(symMe ₂):	symmetric-N ^{ω,ω} -dimethylarginine
Arg(n-Pr):	N ^ω -propylarginine
AzaGly:	azaglycine
β-Ala:	β-alanine
Boc:	tert-butoxycarbonyl
Br-Z:	2-bromobenzyloxycarbonyl
Bu ^t :	tert-butyl
Bzl:	benzyl
CDI:	1,1'-carbonyldiimidazole
Cha:	cyclohexylalanine
CIP:	2-chloro-1,3-dimethylimidazolium tetrafluoroborate
Cit:	citrulline
Clt resin:	2-chlorotrytyl resin
Cl-Z:	2-chlorobenzyloxycarbonyl
Dab:	1,4-diaminobutanoic acid
Dap:	1,3-diaminopropionic acid
Dap(Gly):	N ^β -glycyldiaminopropionic acid
Dap(GnGly):	N ^β -(N-guanidinoglycyl)diaminopropionic acid
DCM:	dichloromethane
DEA:	diethylamine
DIEA:	N,N-diisopropylethylamine
DMF:	N,N-dimethylformamide
EDT:	ethanedithiol
Fmoc:	9-fluorenylmethoxycarbonyl
Gn:	guanidino
Har:	homoarginine
Har(Me):	N ^ω -methylhomoarginine
HOAt:	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt:	1-hydroxybenzotriazole
HONB:	N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboxamide
Hph:	homophenylalanine
IndPr:	3-(indol-3-yl)propionyl
Lys(Me ₂):	N ^{ε,ε} -dimethyllysine
MBHA:	p-methylbenzhydrylamine
MeOH:	methanol
N((CH ₂) ₃ Gn)Gly:	N-(3-guanidinopropyl)glycine
Nal(1):	1-naphthylalanine

-continued

Abbreviation	Description
Nal(2):	2-naphthylalanine
Nar:	norarginine
Nar(Me):	N ^m -methylnorarginine
Nle:	norleucine
NMeArg:	N ^m -methylarginine
NMeLeu:	N ^m -methylleucine
NMePhe:	N ^m -methylphenylalanine
NMeSer:	N ^m -methylserine
Orn:	ornithine
Orn(Mtt):	N ⁶ -(4-methyltryptyl)ornithine
PAL:	5-(4-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminomethyl-3,5-dimethoxy-phenoxy)valeric acid
Pbf:	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Phe(2Cl):	2-chlorophenylalanine
Phe(2F):	2-fluorophenylalanine
Phe(3,4Cl ₂):	3,4-dichlorophenylalanine
Phe(3,4F ₂):	3,4-difluorophenylalanine
Phe(3CF ₃):	3-trifluoromethylphenylalanine
Phe(3Cl):	3-chlorophenylalanine
Phe(3F):	3-fluorophenylalanine
Phe(4Cl):	4-chlorophenylalanine
Phe(4CN):	4-cyanophenylalanine
Phe(4F):	4-fluorophenylalanine
Phe(4Gn):	4-guanidinophenylalanine
Phe(4NH ₂):	4-aminophenylalanine
Phe(4NO ₂):	4-nitrophenylalanine
Phe(4CN):	4-cyanophenylalanine
Phe(F ₅):	pentafluorophenylalanine
Phe? (CSNH)—NH ₂ :	The C-terminal phenylalanylamide is substituted with the phenylalanythioamide.
Phg:	phenylglycine
PhOH:	phenol
PhSMe:	thioanisole
Pro:	proline
Pya(2):	2-pyridylalanine
Pya(3):	3-pyridylalanine
Pya(4):	4-pyridylalanine
PyAOP:	(7-azabenzotriazole-1-yloxy)-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
PyBOP:	(benzotriazole-1-yloxy)-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
PyBrop:	bromo-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
Sar:	N-methylglycine
Tle:	tert-leucine
Trp(For):	N ⁶ -formyltryptophan
Tyr(Me):	O-methyltyrosine
Tyr? (CH ₂ NH)Asn:	The —CONH— bond between Tyr and Asn is substituted with the —CH ₂ NH— bond.
TFA:	trifluoroacetic acid
TFE:	trifluoroethanol

[0818] When bases, amino acids, etc. are indicated by abbreviations in the specification and drawings, the abbreviations are denoted in accordance with the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature or by the common abbreviations in the art, examples of which are shown below. When the amino acids may have the optical isomer, L form is presented unless otherwise indicated.

DNA: deoxyribonucleic acid

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

A: adenine

T: thymine

G: guanine

C: cytosine

Y: thymine or cytosine

N: thymine, cytosine, adenine or guanine

R: adenine or guanine

M: cytosine or adenine

W: thymine or adenine

S: cytosine or guanine

RNA: ribonucleic acid

mRNA: messenger ribonucleic acid

dATP: deoxyadenosine triphosphate

dTTP: deoxythymidine triphosphate

dGTP: deoxyguanosine triphosphate

dCTP: deoxycytidine triphosphate

ATP: adenosine triphosphate

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

SDS: sodium dodecyl sulfate

TFA: trifluoroacetic acid

EIA: enzyme immunoassay

Gly or G: glycine

Ala or A: alanine

Val or V: valine

Leu or L: leucine

Ile or I: isoleucine

Ser or S: serine

Thr or T: threonine

Cys or C: cysteine

Met or M: methionine

Glu or E: glutamic acid

Asp or D: aspartic acid

Lys or K: lysine

Arg or R: arginine

His or H: histidine

Phe or F: phenylalanine

Tyr or Y: tyrosine

Trp or W: tryptophan

Pro or P: proline

Asn or N: asparagine

Gln or Q: glutamine

pGlu: pyroglutamic acid

[0819] The sequence identification numbers in the sequence listing of the specification indicates the following sequence, respectively.

SEQ ID NO: 1

[0820] This shows the amino acid sequence of human-derived metastin.

SEQ ID NO: 2

[0821] This shows the base sequence of DNA encoding human metastin.

SEQ ID NO: 3

[0822] This shows the amino acid sequence of mouse metastin precursor (A).

SEQ ID NO: 4

[0823] This shows the base sequence of DNA encoding mouse metastin precursor (A), which is the base sequence contained in plasmid pCMV-mKiSS-1 harbored on transformant *Escherichia coli* DH10B/pCMV-mKiSS-1.

SEQ ID NO: 5

[0824] This shows the amino acid sequence of mouse metastin precursor (B).

SEQ ID NO: 6

[0825] This shows the base sequence of DNA encoding mouse metastin precursor (B), which is the base sequence contained in plasmid pCR2.1-mKiSS-1.4A harbored on transformant *Escherichia coli* DH5 α /pCR2.1-mKiSS-1.4A.

SEQ ID NO: 7

[0826] This shows the amino acid sequence of rat-derived metastin precursor.

SEQ ID NO: 8

[0827] This shows the base sequence of DNA encoding rat metastin precursor.

SEQ ID NO: 9

[0828] This shows the amino acid sequence of human OT7T175 (metastin receptor).

SEQ ID NO: 10

[0829] This shows the base sequence of DNA encoding human OT7T175 (metastin receptor).

SEQ ID NO: 11

[0830] This shows the amino acid sequence of rat OT7T175 (metastin receptor).

SEQ ID NO: 12

[0831] This shows the base sequence of DNA encoding rat OT7T175 (metastin receptor).

SEQ ID NO: 13

[0832] This shows the amino acid sequence of mouse OT7T175 (metastin receptor).

SEQ ID NO: 14

[0833] This shows the base sequence of DNA encoding mouse OT7T175 (metastin receptor).

SEQ ID NO: 15

[0834] This shows the amino acid sequence of human metastin 15 (40-54).

SEQ ID NO: 16

[0835] This shows the amino acid sequence of human metastin 10 (45-54) (MS10).

SEQ ID NO: 17

[0836] This shows the amino acid sequence of human metastin 9 (46-54).

SEQ ID NO: 18

[0837] This shows the amino acid sequence of human metastin 8 (47-54).

SEQ ID NO: 19

[0838] This shows the base sequence of DNA encoding human metastin 15 (40-54).

SEQ ID NO: 20

[0839] This shows the base sequence of DNA encoding human metastin 10 (45-54).

SEQ ID NO: 21

[0840] This shows the base sequence of DNA encoding human metastin 9 (46-54).

SEQ ID NO: 22

[0841] This shows the base sequence of DNA encoding human metastin 8 (47-54).

[0842] The transformant *Escherichia coli* DH10B/pCMV-mKiSS-1 has been on deposit since Jan. 24, 2000 with International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (the former Ministry of International Trade and Industry, Agency of Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH)), located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code 305-8566), Japan as the Accession Number FERM BP-7003 and since Dec. 16, 1999 with Institute for Fermentation (IFO), located at 2-17-85 Juso-honmachi, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka, Japan, as the Accession Number IFO 16348.

[0843] The transformant *Escherichia coli* DH5 α /pCR2.1-mKiSS-1.4A has been on deposit since Mar. 6, 2000 with International Patent Organisms Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (the former Ministry of International Trade and Industry, Agency of Industrial Science and Technology, National Institute of Bioscience and Human Technology (NIBH)), located at Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki (postal code 305-8566), Japan as the Accession Number FERM BP-7073 and since Feb. 16, 2000 with Institute for Fermentation (IFO) as the Accession Number IFO 16360.

[0844] In the present invention, Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 16) is referred to as Metastin 10, namely, MS10.

[0845] In EXAMPLES later described, the N-terminal Tyr and the C-terminal Phe in MS10 are counted as the 1- and 10-positions, respectively.

[0846] Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂

[0847] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

[0848] For example, [Hph10]MS10 of Compound No. 79 (EXAMPLE 1) means a peptide wherein the C-terminal Phe (10-position) of MS10 is substituted with Hph.

[0849] For example, des(1)-MS10 of Compound No. 4 means a peptide wherein the N-terminal Tyr (1-position) is deleted.

[0850] For example, des(1-3)-Fmoc-MS10 of Compound No. 53 means a peptide wherein the N-terminal Tyr-Asn-Trp (1 to 3-positions) is deleted and the amino group of Asn at the 4-position is modified with Fmoc.

EXAMPLES

Example 1

(Synthesis Process A): Preparation of [Hph10]MS10 (Compound No. 79)

[0851] Using 51 mg of Fmoc-Hph-PAL resin (sub. 0.39 mmol/g), which was prepared by introducing Fmoc-Hph into PAL resin commercially available, the peptide chain was extended on a multiple peptide synthesizer ACT-396 to give Tyr(Bu^t)Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser-(Bu^t)PheGlyLeuArg(Pbf)Hph-PAL resin. To 18.2 mg of the resin, 200 μ L of TFA/PhSMe/m-cresol/TIS/EDT (85/5/5/2.5/2.5) was added and the mixture was shaken for 2 hours. Diethyl ether was added to the reaction solution, the resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The

residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Then, linear density gradient elution (30 minutes) was performed with eluants A/B: 73/27-63/37 using: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC D-ODS-5-ST S-5 120A column (20 \times 150 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 2.6 mg of white powders.

[0852] Mass spectrum (M+H)⁺1316.5 (Calcd. 1316.7)

[0853] Elution time on HPLC: 20.6 mins.

Elution Conditions:

[0854] Column: Wakosil-II 5C18 HG (4.6 \times 100 mm)

[0855] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=100/0-30/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (35 mins.).

[0856] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 2

(Synthesis Process B): Preparation of [Trp(For)10]MS10 (Compound No. 186)

[0857] Using 379 mg of Fmoc-Arg(Pbf)-O-Clt resin (sub. 0.33 mmol/g), which was prepared by introducing Fmoc-Arg(Pbf)-OH into 2-chlorotriylchloride resin (Clt resin, 1.33 mmol/g) commercially available, the peptide chain was extended on ABI 433A to give 540 mg of Boc-Tyr(Bu^t)Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu^t)PheGlyLeuArg(Pbf)-O-Clt resin. To 270 mg of the peptide, 10 mL of AcOH/TFE/DCM (1/1/8) was added the mixture was shaken for 30 minutes. After the resin was removed by filtration, the solvent was concentrated and the residue was dissolved in AcOEt. The solution was then washed with satd. NaCl aq. solution. After drying over Na₂SO₄, the solvent was concentrated and diethyl ether-petroleum ether was added to the residue to give 68 mg of Boc-Tyr(Bu^t)Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser-(Bu^t)PheGlyLeuArg(Pbf)-OH as precipitates. To 22 mg of the peptide, 4 mg of HCl H-Trp(For)-NH₂ (prepared by treating Boc-Trp(For)-NH₂ with 9.7 N HCl/dioxan at 0° C. for 30 minutes), 10 mg of PyAOP, 5 mg of HOAt and 11 μ L of DIEA were added. The mixture was stirred for 15 hours. After the solvent was concentrated, chloroform-diethyl ether was added to the residue to give Boc-Tyr(Bu^t)Asn(Trt)Trp-(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu^t)PheGlyLeuArg(Pbf)Trp(For)-NH₂ as precipitates. To the peptide, 1 mL of TFA/PhSMe/m-cresol/TIS/EDT (85/5/5/2.5/2.5) was added and the mixture was stirred for 2 hours. Diethyl ether was added to the reaction solution, the resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Then, linear density gradient elution (30 minutes) was performed with eluants A/B: 73/27-63/37 using eluant A: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC D-ODS-5-ST S-5 120A column (20 \times 150 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 2.0 mg of white powders.

[0858] Mass spectrum (M+H)⁺1369.3 (Calcd. 1369.6)

[0859] Elution time on HPLC: 19.6 mins.

Elution Conditions:

[0860] Column: Wakosil-II 5C18 HG (4.6×100 mm)

[0861] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=100/0-30/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (35 mins.)

[0862] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 3

(Synthesis Process C): Preparation of
[10Ψ,CSNH]MS10 (Compound No. 128)

[0863] After 264 mg of Boc-Phe-NH₂ was dissolved in 20 mL of THF, 1.62 g of Lawesson's reagent was added to the solution, followed by stirring for 24 hours. Insoluble matters were removed by filtration, the solvent was concentrated and the concentrate was dissolved in AcOEt. The solution was washed with satd. NaHCO₃ aq. solution and then satd. NaCl aq. solution. After drying over Na₂SO₄, the solvent was concentrated and the concentrate was purified by flash column chromatography. Diethyl ether-petroleum ether was added to give 275 mg (yield 98%) of (S)-2-tert-butoxycarbonylamino-3-phenylpropanethioamide (Boc-Phe? (CSNH)—NH₂) as precipitates. After 42 mg of the peptide was treated at 0° C. with 9.7 N HCl to remove Boc, the removal of Fmoc with 10% DEA/DMF treatment followed by condensation by the PyBOP/HOBt method were repeated to give 66 mg of Fmoc-LeuArg(Pbf)Phe? (CSNH)—NH₂ (yield 93%). To 17 mg of Boc-Tyr(Bu')Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu')PheGly-OH prepared as in EXAMPLE 2, H-LeuArg(Pbf)Phe? (CSNH)—NH₂ (prepared by treating 14 mg of Fmoc-LeuArg(Pbf)Phe? (CSNH)—NH₂ with 10% DEA/DMF), 9 mg of PyBOP, 3 mg of HOAt and 7 mL of DIEA were added and the mixture was stirred for 15 hours. After the solvent was concentrated, chloroform-diethyl ether was added thereto for precipitation. To 10 mg of the product, 100 μL of TFA/PhSMc/m-cresol/TIS/EDT (85/5/5/2.5/2.5) was added and the mixture was stirred for 2 hours. Diethyl ether was added to the reaction solution, the resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Then, linear density gradient elution (30 minutes) was performed with eluants A/B: 72/28-62/38 using: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC D-ODS-5-ST S-5 120A column (20×150 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 1.0 mg of white powders.

[0864] Mass spectrum (M+H)⁺1318.4 (Calcd. 1318.6)

[0865] Elution time on HPLC: 21.8 mins.

Elution Conditions:

[0866] Column: Wakosil-II 5C18 HG (4.6×100 mm)

[0867] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=100/0-30/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (35 mins.)

[0868] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 4

(Synthesis Process D): Preparation of
[6Ψ7,CH₂NH]MS10 (Compound No. 163)

[0869] Using 321 mg of Fmoc-Phe-PAL resin, which was prepared by introducing Fmoc-Phe into PAL resin commer-

cially available, the peptide chain was extended on ABI 433A to give Fmoc-LeuArg(Pbf)Phe-PAL resin. To a half volume of the peptide, Fmoc-Gly was condensed to give 190 mg of Fmoc-GlyLeuArg(Pbf)Phe-PAL resin. After 76 mg of the product was subjected to Fmoc deprotection, 2 mL of DMF, 50 μL of AcOH, 46 mg of Fmoc-Phe-H and 8 mg of NaBH₃CN were added thereto, followed by shaking an hour. After washing the resin, 2 mL of DMF, 22 μL of DIEA and 18 μL of Z-Cl were added thereto and the mixture was shaken for 3 hours. After washing the resin, the peptide chain was extended on ABI 433A to give Boc-Tyr(Bu')Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu')Phe? (CH₂NZ)GlyLeuArg(Pbf)Phe-PAL resin. Under ice cooling, 46 μL of TMS-Br, 42 μL of PhSMc, 38 μL of m-cresol, 18 μL of EDT and 227 μL of TFA were added to 15 mg of the peptide and the mixture was stirred for 2 hours. After the solvent was removed by distillation, diethyl ether was added to the residue, the resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Then, linear density gradient elution (30 minutes) was performed with eluants A/B: 72/28-62/38 using: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC D-ODS-5-ST S-5 120A column (20×150 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 2.0 mg of white powders.

[0870] Mass spectrum (M+H)⁺1288.7 (Calcd. 1288.7)

[0871] Elution time on HPLC: 18.2 mins.

Elution Conditions:

[0872] Column: Wakosil-II 5C18 HG (4.6×100 mm)

[0873] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=100/0-0/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (35 mins.)

[0874] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 5

(Synthesis Process E): Preparation of
[Arg(Me)9]MS10 (Compound No. 82)

[0875] In 20 mL of dry DMF, 360 mg of 60% NaH in oil was dissolved and 10 mL of dry DMF solution of 2793 mg of N,N'-Bis-Boc-1-guanylpiprazole was added to the solution at 0° C. The mixture was stirred for 10 minutes. Then, 748 μL of methyl iodide was added to the mixture, followed by stirring at room temperature for 24 hours. After the solvent was removed by distillation, the residue was dissolved in AcOEt, and washed with satd. NaHCO₃ aq. solution and then with satd. NaCl aq. solution. After drying over Na₂SO₄, the solvent was concentrated. Purification by flash column chromatography gave 2.96 g of N-methyl-N,N'-bis-Boc-1-guanylpiprazole (yield 91%). Using 480 mg of Fmoc-Phe-Rink Amide MBHA resin, which was prepared by introducing Fmoc-Phe into Rink Amide MBHA resin commercially available, the peptide chain was extended on ABI 433A to give 1080 mg of Boc-Tyr(Bu')Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu')PheGlyLeuOrn(Mtt)Phe-Rink Amide MBHA resin. To 540 mg of the peptide, 10 mL of TFA/TIS/DCM (Jan. 5, 1994) was added and the mixture was shaken for 50 minutes. The resin was washed and then dried. After

2 mL of DMF, 49 mg of N-methyl-N'-bis-Boc-1-guanylpurazole prepared in REFERENCE EXAMPLE 1 and 87 μ L of DIEA were added to $\frac{3}{4}$ volume of the resin, the mixture was shaken for 15 hours to give 220 mg of Boc-Tyr(Bu^t)Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser-(Bu^t)PheGlyLeuArg(Boc₂,Me)Phe-Rink Amide MBHA resin. To 50 mg of the peptide, 1 mL of TFA/PhSMe/m-cresol/TIS/EDT (85/5/5/2.5/2.5) was added and the mixture was stirred for 2 hours. Diethyl ether was added to the reaction solution, the resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Then, linear density gradient elution (30 minutes) was performed with eluants A/B: 74/26-64/36 using: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC D-ODS-5-ST S-5 120A column (20 \times 150 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 10.5 mg of white powders.

[0876] Mass spectrum (M+H)⁺1316.5 (Calcd. 1316.7)

[0877] Elution time on HPLC: 20.1 mins.

Elution Conditions:

[0878] Column: Wakosil-II 5C18 HG (4.6 \times 100 mm)

[0879] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=100/0-30/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (35 mins.)

[0880] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 6

(Synthesis Process F): Preparation of
[6 Ψ 7,CSNH]MS10 (Compound No. 166)

[0881] After 503 mg of HCl H-Gly-OBu^t was dissolved in 10 mL of DMF, 1162 mg of Fmoc-Phe, 608 mg of HOBt, 1874 mg of PyBOP and 784 μ L of DIEA were added to the solution at 0° C. The mixture was stirred for 4 hours. The solvent was then removed by distillation. The residue was dissolved in AcOEt and the solution was washed with 1N HCl aq. solution, satd. NaHCO₃ aq. solution and then satd. NaCl aq. solution. After drying over Na₂SO₄, the solvent was concentrated and diethyl ether-petroleum ether was added to give 1.48 g of Fmoc-PheGly-OBu^t as precipitates (yield 99%). After 250 mg of the product was dissolved in 10 mL of toluene, 404 mg of Lawesson's reagent was added to the solution, followed by stirring at 80° C. for 2 hours. The solvent was concentrated and the concentrate was dissolved in AcOEt. The solution was then washed with satd. NaHCO₃ aq. solution and then satd. NaCl aq. solution. After drying over Na₂SO₄, the solvent was concentrated and the concentrate was purified by flush column chromatography. Diethyl ether-petroleum ether was added to the eluate to give 207 mg of Fmoc-Phe? (CSNH)Gly-OBu^t as precipitates (yield 80%). To 103 mg of the product, TFA/H₂O (95/5) was added and the mixture was stirred for an hour. After the solvent was concentrated, diethyl ether was added to give 82.4 mg of Fmoc-Phe? (CSNH)Gly-OH as precipitates (yield 90%). Using Fmoc-Phe-PAL resin, which was prepared by introducing Fmoc-Phe into PAL resin commercially available, the peptide chain was extended on ABI 433A and 80 mg of Fmoc-LeuArg(Pbf)Phe-PAL resin thus

extended was subjected to Fmoc deprotection. Then, 35 mg of Fmoc-Phe? (CSNH)Gly-OH, 47 mg of PyBOP, 14 mg of HOAt and 35 μ L of DIEA were added to the resin, and the mixture was shaken for 15 hours. After washing the resin, the peptide chain was extended on ABI 433A to give Boc-Tyr(Bu^t)Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser-(Bu^t)Phe? (CSNH)GlyLeuArg(Pbf)Phe-PAL resin. To 15 mg of the product, 200 μ L of TFA/PhSMe/m-cresol/TIS/EDT (85/5/5/2.5/2.5) was added, followed by stirring for 2 hours. Diethyl ether was added to the reaction solution, the resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Then, linear density gradient elution (60 minutes) was performed with eluants A/B: 77/23-57/43 using: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC D-ODS-5-ST S-5 120A column (20 \times 150 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 1.0 mg of white powders.

[0882] Mass spectrum (M+H)⁺1318.7 (Calcd. 1318.6)

[0883] Elution time on HPLC: 20.8 mins.

Elution Conditions:

[0884] Column: Wakosil-II 5C18 HG (4.6 \times 100 mm)

[0885] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=100/0-30/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (35 mins.)

[0886] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 7

(Synthesis Process G): Preparation of
[AzaGly7]MS10 (Compound No. 176)

[0887] Using 321 mg of Fmoc-Phe-PAL resin, which was prepared by introducing Fmoc-Phe into PAL resin commercially available, the peptide chain was extended on ABI 433A and 80 mg of Fmoc-LeuArg(Pbf)Phe-PAL resin thus extended was subjected to Fmoc deprotection. After 2 mL of THF and 16 mg of CDI were added, the mixture was shaken for 2 hours. Then 6 μ L of hydrazine monohydrate was added to the mixture. The mixture was shaken for an hour and the resin was then washed. After 39 mg of Fmoc-Phe, 93 mg of PyBOP, 27 mg of HOAt and 105 μ L of DIEA were added to the mixture, followed by shaking for 2 hours. The resin was washed and the peptide chain was extended on ABI 433A to give Boc-Tyr(Bu^t)Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser-(Bu^t)PheAzaGlyLeuArg(Pbf)Phe-PAL resin. To 25 mg of the product, 1 mL of TFA/PhSMe/m-cresol/TIS/EDT (85/5/5/2.5/2.5) was added, and the mixture was shaken for 2 hours. Diethyl ether was added to the reaction solution, the resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Linear density gradient elution (30 minutes) was performed with eluants A/B: 74/26-64/36 using: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC D-ODS-5-ST S-5 120A column (20 \times 150 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 5.5 mg of white powders.

[0888] Mass spectrum (M+H)⁺1303.3 (Calcd. 1303.6)

[0889] Elution time on HPLC: 18.9 mins.

Elution Conditions:

[0890] Column: Wakosil-II 5C18 HG (4.6×100 mm)

[0891] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=100/0-30/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (35 mins.)

[0892] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 8

(Synthesis Process H): Preparation of
[D-Tyr1,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 (Compound No.
232)

[0893] Fmoc-Phe and Fmoc-Orn(Mtt) were introduced into 4 g (0.55 mmol/g) of Rink Amide MBHA resin commercially available to prepare Fmoc-Orn(Mtt)-Phe-Rink Amide MBHA resin, and 50 mL of TFA/TIS/DCM (Jan. 5, 1994) was added to the resin. The mixture was then shaken for 50 minutes. After washing the resin, 40 mL of DCM and 2.27 g of N-methyl-N,N'-bis-Boc-1-guanylpiperazine prepared in EXAMPLE 5 were added to the resin. DIEA was added to the mixture to adjust pH of the solution to 9. The mixture was shaken for 15 hours to give 4.74 g of Fmoc-Arg(Boc₂,Me)-Phe-Rink Amide MBHA resin. Separately, 145 mg of Fmoc-NHNH₂ HCl was suspended in 10 mL of THF. Under ice cooling, 89 mg of CDI and 87 mL of DIEA were added to the suspension, followed by stirring at room temperature for an hour. Under ice cooling, a solution of 224 mg of H-Leu-OBu^t HCl in 5 mL of DMF was added to the mixture. While reverting to room temperature, the mixture was stirred for 18 hours. After the solvent was distilled off, the residue was dissolved in AcOEt and the solution was washed with 1N HCl aq. solution, satd. NaHCO₃ aq. solution and then satd. NaCl aq. solution. After drying over Na₂SO₄, the solvent was concentrated. Purification by flash column chromatography gave 230 mg of Fmoc-AzaGly-Leu-OBu^t (yield 99%). To 187 mg of the product, 10 mL of TFA/H₂O (9/1) was added, followed by stirring for an hour. After the solvent was distilled off, the residue was dissolved in AcOEt and the solution was washed with satd. NaCl aq. solution. After drying over Na₂SO₄, the solvent was concentrated and diethyl ether was added to give 143 mg of Fmoc-AzaGly-Leu-OH as precipitates (yield 87%). To Trt-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Boc₂,Me)-Phe-Rink Amide MBHA resin prepared by introducing the resulting Fmoc-AzaGly-Leu-OH and Trt-Phe into Fmoc-Arg(Boc₂,Me)-Phe-Rink Amide MBHA resin, 50 mL of TFA/TIS/DCM (Jan. 5, 1994) was added and the mixture was shaken for 50 minutes. After the resin was washed and neutralized, Fmoc-Ser(Bu^t) and then Fmoc-Asn(Trt) were introduced into the resin. Using 80.3 mg of the resulting Fmoc-Asn(Trt)Ser(Bu^t)Phe-AzaGly-LeuArg(Boc₂,Me)-Phe-Rink Amide MBHA resin, the peptide chain was extended to give 97.2 mg of H-D-Tyr(Bu^t)Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu^t)Phe-AzaGly-LeuArg(Boc₂,Me)-Phe-Rink Amide MBHA resin. To the resin obtained, 1 mL of TFA/PhSMe/m-cresol/H₂O/TIS/EDT (80/5/5/2.5/2.5) was added, and the mixture was stirred for 90 minutes. Diethyl ether was added to the reaction solution, the resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The

residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Linear density gradient elution (60 minutes) was then performed with eluants A/B: 76/24-66/34 using: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC SH-343-5 S-5, 120A column (20×250 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 11.7 mg of white powders.

[0894] Mass spectrum (M+H)⁺1317.0 (Calcd. 1317.6)

[0895] Elution time on HPLC: 21.0 mins.

Elution Conditions:

[0896] Column: Wakosil-II 5C18 HG (4.6×100 mm)

[0897] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=100/0-30/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (35 mins.)

[0898] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 9

(Synthesis Process I): Preparation of des(1-3)-3-pyridinepropionyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10
(Compound No. 322)

[0899] In Fmoc-Asn(Trt)Ser(Bu^t)Phe-AzaGly-LeuArg-(Boc₂,Me)-Phe-Rink Amide MBHA resin prepared in EXAMPLE 8, 48.2 mg of the resin was subjected to Fmoc deprotection. The resin was treated with 15.2 mg of 3-(3-pyridyl)propionic acid commercially available, 15.9 μL of DIPCDI and 200 μL of 0.5M HOAt/DMF at room temperature for 90 minutes. After the resin obtained was washed and dried, 1 mL of TFA/PhSMe/m-cresol/H₂O/TIS/EDT (80/5/5/2.5/2.5) was added to the resin, and the mixture was stirred for 90 minutes. Diethyl ether was added to the reaction solution, the resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Linear density gradient elution (60 minutes) was then performed with eluants A/B: 80/20-60/40 using: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC SH-343-5 S-5, 120A column (20×250 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 6.0 mg of white powders.

[0900] Mass spectrum (M+H)⁺987.4 (Calcd. 987.5)

[0901] Elution time on HPLC: 8.1 mins.

Elution Conditions:

[0902] Column: YMC-AM301 (4.6×100 mm)

[0903] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=80/20-30/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (25 mins.)

[0904] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 10

(Synthesis Process J): Preparation of des(1-2)-Amino-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10 (Compound No.
273)

[0905] After Fmoc-Trp(Boc) was introduced into 48.2 mg of Fmoc-Asn(Trt)Ser(Bu^t)Phe-AzaGly-LeuArg(Boc₂,Me-

)Phe-Rink Amide MBHA resin prepared in EXAMPLE 8, the resin was subjected to Fmoc deprotection to give H-Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu')Phe-AzaGly-LeuArg(Boc₂,Me)-Phe-Rink Amide MBHA resin. The resin thus obtained was treated in DMF with 29.3 mg of N,N'-bis-Boc-1-guanylpurazole and 34.8 μ L of DIEA for 14 hours at room temperature for 14 hours to give Amidino-Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu')Phe-AzaGly-LeuArg(Boc₂,Me)-Phe-Rink Amide MBHA resin. After washing and drying the resin, 1 mL of TFA/PhSMe/m-cresol/H₂O/TIS/EDT (80/5/5/5/2.5/2.5) was added to the resin, and the mixture was stirred for 90 minutes. Diethyl ether was added to the reaction solution, the resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Linear density gradient elution (60 minutes) was then performed with eluants A/B: 78/22-58/42 using: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC SH-343-5 S-5, 120A column (20 \times 250 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 0.6 mg of white powders.

[0906] Mass spectrum (M+H)⁺1082.3 (Calcd. 1082.6)

[0907] Elution time on HPLC: 11.4 mins.

Elution Conditions:

[0908] Column: YMC-AM301 (4.6 \times 100 mm)

[0909] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=80/20-30/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (25 mins.)

[0910] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 11

(Synthesis Process K): Preparation of
[6 Ψ 7,NHCO,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10 (Compound
No. 319)

[0911] In 30 mL of MeCN, 5.99 g of Z-Phe was dissolved, and 3.94 g of HONB and 4.59 g of WSCD HCl were added to the solution at 0° C., followed by stirring at room temperature for 4 hours. While keeping at 0° C., 3.4 mL of 25% NH₃ aq. solution and 10 mL of DMF were added to the mixture, followed by stirring for 4 hours. After the solvent was distilled off, the residue was dissolved in AcOEt and the solution was washed with 1N HCl aq. solution, satd. NaHCO₃ aq. solution and then satd. NaCl aq. solution. After drying over Na₂SO₄, the solvent was concentrated and diethyl ether was added to give 1.48 g of Z-Phe-NH₂ as precipitates (yield 99%). After 1.94 g of [Bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzene was dissolved in 20 mL of MeCN and 5 mL of H₂O, 890 mg of Z-Phe-NH₂ prepared above and 972 μ L of pyridine were added to the precipitate at 0° C., and the mixture was stirred at room temperature for 15 hours. After the solvent was concentrated, the concentrate was subjected to liquid-liquid separation with diethyl ether-1N HCl aq. solution. The 1N HCl aq. solution layer was concentrated and then dried. A half volume of the concentrate was dissolved in 5 mL of DMF, and 486 μ L of mono-tert-butyl malonate and 540 mg of HOBt were added to the solution. Then, 2.08 g of PyBOP and 1394 μ L of DIEA were added to the mixture at 0° C., followed by stirring at room temperature for 15 hours. The solvent was distilled off, the

residue was dissolved in AcOEt and the solution was washed with 1N HCl aq. solution, satd. NaHCO₃ aq. solution and then satd. NaCl aq. solution. After drying over Na₂SO₄, the solvent was concentrated and the concentrate was purified by flush column chromatography. Diethyl ether-petroleum ether was added to give 304 mg (yield 33%) of Z-Phe? (NHCO)Gly-OBu' as precipitates. After 154 mg of the product was dissolved in 20 mL of MeOH, 10% Pd—C was added to the solution, followed by catalytic hydrogenation for 2 hours in a hydrogen flow. After removal of the catalyst by filtration, the solvent was concentrated and dried. The residue was dissolved in 10 mL of MeCN 10 mL and 152 mg of Fmoc-OSu and 78 μ L of DIEA were added to the solution, followed by stirring for 15 hours. After the solvent was distilled off, the residue was dissolved in AcOEt and the solution was washed with 1N HCl aq. solution, satd. NaHCO₃ aq. solution and then satd. NaCl aq. solution. After drying over Na₂SO₄, the solvent was concentrated and diethyl ether-petroleum ether was added to give 127 mg of Fmoc-Phe? (NHCO)Gly-OBu' as precipitates (yield 68%). Fmoc-Leu was introduced into 63 mg of Fmoc-Arg(Boc₂,Me)Phe-Rink Amide MBHA resin prepared in EXAMPLE 10. Following Fmoc deprotection, Fmoc-Phe? (NHCO)Gly-OH (prepared by treating 25 mg of Fmoc-Phe? (NHCO)Gly-OBu' with TFA for 3 minutes), 300 μ L of 0.5M HOAt, 78 mg of PyAOP and 52 μ L of DIEA were added to the resin, and the mixture was shaken for 6 hours. After washing the resin, 2 mL of DMF, 9 μ L of DIEA and 12 μ L of Ac₂O were added to the resin, and the mixture was shaken for 30 minutes. After washing the resin, the peptide chain was extended on ABI 433A to give Boc-D-Tyr(Bu')Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser(Bu')Phe? (NHCO)GlyLeuArg(Boc₂,Me)Phe-Rink Amide MBHA resin. To 34 mg of the product, 200 μ L of TFA/PhSMe/m-cresol/TIS/EDT (85/5/5/2.5/2.5) was added, and the mixture was stirred for 2 hours. Ether was added to the reaction solution. The resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Linear density gradient elution (60 minutes) was then performed with eluants A/B: 76/24-66/34 using: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC D-ODS-5-ST S-5 120A column (20 \times 150 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 0.7 mg of white powders.

[0912] Mass spectrum (M+H)⁺1316.3 (Calcd. 1316.7)

[0913] Elution time on HPLC: 18.7 mins.

Elution Conditions:

[0914] Column: Wakosil-II 5C18 HG (4.6 \times 100 mm)

[0915] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=100/0-0/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (35 mins.)

[0916] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 12

(Synthesis Process L): Preparation of
[N((CH₂)₃Gn)Gly9]-MS10 (Compound No. 218)

[0917] Using 192 mg of Fmoc-Phe-Rink Amide MBHA resin, the peptide chain was extended on ABI 433A to give

Fmoc-GlyPhe-Rink Amide MBHA resin. After a ¼ volume of the product was subjected to Fmoc deprotection, 2 mL of DMF, 50 µL of AcOH, 5 mg of Boc-β-Ala-H and 16 mg of NaBH₃CN were added thereto and the mixture was shaken for 30 minutes. After washing the resin, 71 mg of Fmoc-Leu, 56 mg of CIP, 27 mg of HOAt and 105 mL of DIEA were added to the resin, and the mixture was shaken for 15 hours. After washing the resin, the peptide chain was extended on ABI 433A to give Z-Tyr(Bzl)Asn(Trt)Trp(Boc)Asn(Trt)Ser-(Bu)^tPheGlyLeuN ((CH₂)₃NHBoc)GlyPhe-Rink Amide MBHA resin. To the product, 1 mL of TFA/PhOH/H₂O/TIS/EDT (87.5/5/2.5/2.5/2.5) was added and the mixture was stirred for 2 hours. After the resin was removed by filtration and then concentrated, ether was added to the concentrate. A half volume of the resulting precipitate was dissolved in 500 µL of DMF, and 9 mg of 1H-pyrazole-1-carboxamide hydrochloride and 22 mL of DIEA were added to the solution. The mixture was then stirred for 15 hours. The solvent was distilled off and ether was added to precipitate. Under ice cooling, 60 µL of PhSMe, 56 µL of m-cresol, 26 µL of EDT, 337 µL of TFA and 65 µL of TMSBr were added to the mixture, followed by stirring for 2 hours. After the solvent was distilled off, ether was added to the residue. The resulting precipitate was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated for washing. The residue was extracted with an aqueous acetic acid solution and the extract was filtered to remove the resin. Linear density gradient elution (60 minutes) was then performed with eluants A/B: 74/26-64/36 using: 0.1% TFA in water and eluant B: 0.1% TFA-containing acetonitrile on preparative HPLC using YMC D-ODS-5-ST S-5 120A column (20×150 mm). The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 1.8 mg of white powders.

[0918] Mass spectrum (M+H)⁺1302.5 (Calcd. 1302.7)

[0919] Elution time on HPLC: 18.6 mins.

Elution Conditions:

[0920] Column: Wakosil-II 5C18 HG (4.6×100 mm)

[0921] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=100/0-30/70, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (35 mins.)

[0922] Flow rate: 1.0 ml/min.

Example 13

(Synthesis Process M): Preparation of MS10
(Compound No. 3)

[0923] Commercially available p-methyl BHA resin (0.77 mmol/g resin) was charged in a reaction tank of peptide synthesizer ABI 430A. Boc-Phe, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Phe, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asn, Boc-Trp(For), Boc-Asn, and Boc-Tyr(Br-Z) were introduced into the resin in this order, in accordance with the Boc-strategy (DCC-HOBt) peptide synthesis to give the objective peptide resin protected. This resin, 0.11 g, was stirred at 0° C. for 60 minutes in 10 ml of anhydrous hydrogen fluoride containing 1 ml of p-cresol and 1.2 ml of 1,4-butanediol. The hydrogen fluoride was then distilled off in vacuum. Diethyl ether was added to the residue and the precipitate was filtrated. To the precipitate 50% acetic acid aqueous solution was added for extraction to remove insoluble matters. After sufficiently concentrating the extract, the concentrate was applied to Sephadex (trade name) G-25 column (2.0×80 cm) filled with 50% acetic acid aqueous solution followed by development with the same solvent. The main fractions were collected and lyophilized to give 40 mg of white powders. A half volume of the powders was applied to column chromatography (2.6×60 cm) packed with LiChrorep (trade name) RP-18 followed by washing with 200 ml of water containing 0.1% TFA. Linear density gradient elution was performed with 300 ml of 0.1% TFA in water and 300 ml of 0.1% TFA-containing 33% acetonitrile. The main fractions were collected and lyophilized to give 2.2 mg of the desired peptide.

[0924] Elemental analysis (M+H) 1302.5 (Calcd. 1302.6)

[0925] Elution time on HPLC: 18.7 mins.

Elution Conditions:

[0926] Column: Wakosil-II 5C 18T 4.6×100 mm

[0927] Eluant: linear density gradient elution with eluants A/B=95/5-45/55, using 0.1% TFA in water as eluant A and 0.1% TFA-containing acetonitrile (25 mins.)

[0928] Flow rate: 1.0 ml/min.

[0929] The structures of compounds synthesized as in EXAMPLES 1 to 11 and physicochemical properties of these compounds are shown in TABLES 1 to 11 below.

TABLE 1

Compd. No.		M + H ⁺ (obs.)	M + H ⁺ (cal.)	HPLC (min.)	HPLC Mode	Synthesis Process
1	Metastin	5858.35	5858.51	18.1	d	N
2	Lys-Asp-Leu-Pro-Asn-MS10	1869.6	1869.9	18.6	d	N
3	MS10	1302.5	1302.6	18.7	d	N
4	des(1)-MS10	1139.6	1139.6	18.1	d	N
17	[Pya(4)10]MS10	1303.6	1303.6	14.7	d	N
18	[Tyr(Me)10]MS10	1332.7	1332.7	17.7	d	N
19	[Phe(2F)10]MS10	1320.5	1320.6	17.8	d	N
23	[Tyr5]MS10	1378.6	1378.8	18.6	d	N
24	[Leu5]MS10	1328.7	1328.7	19.8	d	N
30	Acetyl-MS10	1344.5	1344.6	29.2	b	A
31	Fmoc-MS10	1524.6	1524.7	23.1	b	A
38	[D-Ser5]MS10	1302.5	1302.6	11.8	c	A
39	[D-Asn4]MS10	1302.5	1302.6	11.6	c	A
40	[D-Trp3]MS10	1302.5	1302.6	11.5	c	A

TABLE 1-continued

Compd. No.		M + H ⁺ (obs.)	M + H ⁺ (cal.)	HPLC (min.)	HPLC Mode	Synthesis Process
41	[D-Asn2]MS10	1302.5	1302.6	11.7	c	A
42	[D-Tyr1]MS10	1302.5	1302.6	11.4	c	A
44	[Lys9]MS10	1274.6	1274.6	11.7	c	A
45	[Ala8]MS10	1260.5	1260.6	10	c	A
50	[Ala7]MS10	1316.3	1316.7	12.2	c	A
51	[NMePhe10] MS10	1316.3	1316.7	22.7	a	A
53	des(1-3)-Fmoc- MS10	1061.2	1061.5	27.3	a	A
54	des(1-2)-Fmoc- MS10	1247.4	1247.6	29.6	a	A
55	des(1)-Fmoc- MS10	1361.6	1361.6	28.2	a	A
56	[Lys2]MS10	1316.6	1316.7	16.8	d	N
57	[Asp2]MS10	1303.7	1303.6	17.7	d	N
58	[Tyr2]MS10	1351.7	1351.7	18.2	d	N
59	[Leu2]MS10	1301.6	1301.7	19.2	d	N
60	[Pya(3)10]MS10	1303.6	1303.6	14.7	d	N
61	[Phe(4F)10] MS10	1320.6	1320.6	18.0	d	N
67	[Ala3]MS10	1187.4	1187.6	9.3	c	A
68	[Leu3]MS10	1229.6	1229.6	11.1	c	A
69	[Ser3]MS10	1203.5	1203.6	8.9	c	A

[0930]

TABLE 2

70	[Asp3]MS10	1231.6	1231.6	9	c	A
71	[Lys3]MS10	1244.6	1244.7	8.1	c	A
72	[Ala1]MS10	1210.5	1210.6	11.1	c	A
73	[Leu1]MS10	1252.6	1252.7	12.5	c	A
74	[Ser1]MS10	1226.6	1226.6	10.9	c	A
75	[Asp1]MS10	1254.4	1254.6	11	c	A
76	[Lys1]MS10	1267.6	1267.7	10	c	A
77	[Phe(4CN)10] MS10	1327.5	1327.6	17.2	d	N
78	[Trp(For)3, Phe(4CN)10] MS10	1355.6	1355.6	17.4	d	N
79	[Hph10]MS10	1316.5	1316.7	20.6	a	A
81	[NMeArg9]MS10	1316.3	1316.7	23.3	a	A
82	[Arg(Me)9]MS10	1316.5	1316.7	20.1	a	E
83	[Arg(asyMe2) 9]MS10	1330.4	1330.7	21.3	a	A
87	des(4-5)-Boc- MS10	1201.6	1201.6	22.5	d	A
88	des(4-5)-MS10	1101.5	1101.5	18.6	d	A
90	[9Ψ10,CH ₂ NH] MS10	1260.6	1260.7	19.8	a	D
91	[8Ψ9,CH ₂ NH] MS10	1288.7	1288.7	20.5	a	D
97	[Har9]MS10	1316.3	1316.7	11.9	c	A
98	[Lys(Me ₂)9] MS10	1302.6	1302.7	11.8	c	A
101	[Ser7]MS10	1332.6	1332.6	11.6	c	A
105	[Nle8]MS10	1302.3	1302.6	11.9	c	A
107	[Val8]MS10	1288.5	1288.6	11	c	A
109	[Tyr10]MS10	1408.4	1408.7	10.2	c	A
110	[Nal(2)10]MS10	1332.4	1332.6	13.5	c	A
111	[Phe(F ₃)10] MS10	1342.4	1342.7	13.5	c	A
112	[Cha10]MS10	1360.3	1360.6	13.4	c	A
114	des(1-3)-3-(3- Indolyl)propionyl- MS10	1010.5	1010.5	13.8	c	A + I
121	des(1-4)-[Trp5] MS10	824.3	824.5	22.5	d	N
123	[NMeLeu8]MS10	1316.7	1316.7	12.7	c	A

TABLE 2-continued

126	[NMeSer5]MS10	1317	1316.7	11.8	c	A
127	[D-Asn4,NMe Phe6]MS10	1316.7	1316.7	11.8	c	A
128	[10Ψ,CSNH] MS10	1318.4	1318.6	21.8	a	C
129	[Arg(symMe2) 9]MS10	1331.2	1330.7	20.9	a	A

[0931]

TABLE 3

130	[Phe(4Cl)10] MS10	1336.4	1336.6	13.1	c	A
131	[Phe(4NH ₂)10] MS10	1317.4	1317.6	8.3	c	A
132	[Phe(4NO ₂)10] MS10	1347.4	1347.6	12.2	c	A
133	[Nal(1)10]MS10	1352.6	1352.7	13.5	c	A
134	[Trp10]MS10	1341.5	1341.6	12	c	A
137	[Nle9]MS10	1259.4	1259.6	15.3	c	A
138	[Cit9]MS10	1303.4	1303.6	12.2	c	A
140	[Arg(Me)9,NMe Phe10]MS10	1330.4	1330.7	21	a	E
141	[D-Tyr1,Arg (Me)9]MS10	1316.9	1316.7	20.2	a	E
142	[D-Tyr1,D-Trp3, Arg(Me) 9]MS10	1316.7	1316.7	20.1	a	E
143	[D-Trp3,Arg (Me)9]MS10	1316.7	1316.7	20.3	a	E
144	des(1-3)-Fmoc- [Arg(Me)9] MS10	1075.2	1075.5	26	a	E
145	des(1-2)-Fmoc- [Arg(Me)9] MS10	1261.2	1261.6	28.6	a	E
146	[10Ψ,CSNH, D-Tyr1]MS10	1318.4	1318.6	21.4	a	C
150	[Tyr6]MS10	1318.4	1318.6	10.2	c	A
151	[Nal(1)6]MS10	1352.6	1352.7	13.5	c	A
152	[Nal(2)6]MS10	1352.6	1352.7	13.6	c	A
153	[Phe(F ₃)6]MS10	1392.5	1392.6	13.7	c	A
154	[Phe(4F)6]MS10	1320.8	1320.6	12.3	c	A
156	[Cha6]MS10	1308.2	1308.5	13.2	c	A
163	[6Ψ7,CH ₂ NH] MS10	1288.7	1288.7	18.2	a	D
165	[Dap(Gly)9]- MS10	1289.8	1289.6	19.2	a	E
166	[6Ψ7,CSNH] MS10	1318.7	1318.6	20.8	a	F
169	[D-Tyr1,Ala3, Arg(Me)9] MS10	1202.1	1201.6	9	c	E
170	[D-Tyr1,Ser3, Arg(Me)9] MS10	1218.2	1217.6	8.8	c	E
171	[D-Tyr1,Cha3, Arg(Me)9] MS10	1284.2	1283.7	12.1	c	E
172	[D-Tyr1,Cha6, Arg(Me)9] MS10	1402.9	1322.7	13.1	c	E
173	[D-Tyr1,Ala7, Arg(Me)9] MS10	1410.9	1330.7	12.2	c	E
174	[D-Tyr1,Arg (Me)9,Trp10] MS10	1335.3	1335.7	11.7	c	E
176	[AzaGly7]MS10	1303.3	1303.6	18.9	a	G

TABLE 3-continued

181	[D-Tyr1,Cha3,6,Arg(Me)9]MS10	1370.6	1370.6	13.9	c	E
182	[D-Tyr1,Cha3,6,Arg(Me)9,Trp10]MS10	1328.2	1328.7	21.3	a	E
183	[Phe(4NH ₂)9]MS10	1328.2	1308.6	19.4	a	A

[0932]

TABLE 4

184	[Phe(4-Guanidino)9]MS10	1350.4	1350.6	19.7	a	E
185	[Dap(GnGly)9]MS10	1331.2	1331.6	19.1	a	E
186	[Trp(For)10]MS10	1369.3	1369.6	19.6	a	B
187	[Abu8]MS10	1274.4	1274.6	10.4	c	A
189	[Ala(3-Bzt)10]MS10	1358.4	1358.6	13.4	c	A
190	[D-Tyr1,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1284.5	1284.7	19.3	a	H
191	[D-Tyr1,Ser3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1218.4	1218.6	15.9	a	H
192	[D-Tyr1,Arg(Et)9]MS10	1330.5	1330.7	18.9	a	E
193	[D-Tyr1,Arg(n-Pr)9]MS10	1344.8	1344.7	19.4	a	E
194	[D-Tyr1,Arg(Ac)9]MS10	1345.1	1344.6	18.8	a	E
197	[Phe(3F)10]MS10	1320.6	1320.6	12.2	c	A
198	[Phe(3,4F ₂)10]MS10	1338.7	1338.6	12.7	c	A
199	[Phe(3,4Cl ₂)10]MS10	1370.6	1370.6	13.1	c	A
200	[Phe(3CF ₃)10]MS10	1370.6	1370.6	13.1	c	A
201	[Ala(2-Qui)10]MS10	1353.4	1353.6	9.8	c	A
203	[D-Tyr1,Cha6,Arg(Me)9]MS10	1322.4	1322.7	12.9	c	E
204	[D-Tyr1,Ala7,Arg(Me)9]MS10	1330.4	1330.7	11.7	c	E
205	[D-Tyr1,Thr3,Arg(Me)9]MS10	1231.4	1231.6	9	c	E
206	[D-Tyr1,Ile3,Arg(Me)9]MS10	1243.6	1243.7	10.1	c	E
207	[D-Tyr1,Ser4,Arg(Me)9]MS10	1289.5	1289.6	11.7	c	E
208	[D-Tyr1,Thr4,Arg(Me)9]MS10	1303.4	1303.7	12	c	E
209	[D-Tyr1,Gln4,Arg(Me)9]MS10	1330.8	1330.7	11.6	c	E
210	[D-Tyr1,Ala4,Arg(Me)9]MS10	1273.7	1273.6	12.3	c	E

TABLE 4-continued

211	[D-Tyr1,Thr5, Arg(Me)9] MS10	1330.7	1330.7	11.7	c	E
212	[D-Tyr1,Ala5, Arg(Me)9] MS10	1300.5	1300.7	12.1	c	E
213	[D-Tyr1,Val8, Arg(Me)9] MS10	1302.5	1302.6	10.4	c	E
214	[D-Tyr1,Gln2, Arg(Me)9] MS10	1330.5	1330.7	11.4	c	E
215	[D-Tyr1,Thr2, Arg(Me)9] MS10	1303.4	1303.7	11.9	c	E
216	des(1)-[D-Asn2, Arg(Me)9] MS10	1153.3	1153.6	11.1	c	E
217	des(1)-[D-Tyr2, Arg(Me)9] MS10	1202.4	1202.6	12.3	c	E
218	[N((CH ₂) ₃ Gn)) Gly9]MS10	1302.5	1302.7	18.6	a	M
220	[Arg(Et)9]MS10	1330.7	1330.7	19.5	a	E

[0933]

TABLE 5

221	[D-Tyr1,Thr3, AzaGly7,Arg (Me)9] MS10	1232.5	1232.6	16.1	a	H
222	des(1)-[D-Tyr2, AzaGly7, Arg(Me)9]MS10	1203.5	1203.6	19.3	a	H
223	des(1-2)-[D- Trp3,Arg(Me) 9]MS10	1039.5	1039.5	11	c	E
224	des(1)-[D-Tyr2, D-Trp3,Arg (Me)9]MS10	1202.4	1202.6	12.2	c	E
225	des(1)-[D-Asn2, D-Trp3,Arg (Me)9]MS10	1153.6	1153.6	11.1	c	E
226	des(1)-[D-Tyr2, Ser3,Arg (Me)9] MS10	1103.5	1103.6	9.5	c	E
227	des(1)-[D-Tyr2, Thr3,Arg (Me)9] MS10	1117.3	1117.6	9.8	c	E
228	des(1)-[D-Tyr2, Ile3,Arg (Me)9]MS10	1129.6	1129.6	11.5	c	E
229	[D-Tyr1,Val3, Arg(Me)9] MS10	1229.5	1229.6	9.7	c	E
230	[D-Tyr1,D-Asn2, Arg(Me) 9]MS10	1316.5	1316.7	11.8	c	E
231	[D-Tyr1,D-Asn2, D-Trp3, Arg(Me)9]MS10	1316.3	1316.7	11.7	c	E
232	[D-Tyr1,Aza Gly7,Arg(Me) 9]MS10	1317	1317.6	21	a	H
233	[D-Tyr1,Ile3, AzaGly7,Arg (Me)9] MS10	1244.1	1244.7	20.9	a	H

TABLE 5-continued

234	[D-Tyr1,Val3, AzaGly7,Arg (Me)9] MS10	1230.5	1230.6	20.6	a	H
235	[D-Tyr1,Ala3, AzaGly7,Arg (Me)9] MS10	1202.5	1202.6	20.5	a	H
236	[D-Tyr1,D-Trp3, AzaGly7, Arg(Me)9]MS10	1317.6	1317.6	20.9	a	H
237	[D-Tyr1,D-Asn2, AzaGly7, Arg(Me) 9]MS10	1317.6	1317.6	20.9	a	H
238	[D-Tyr1,D-Asn2, D-Trp3, AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1317.6	1317.6	20.6	a	H
239	des(1)-[D-Tyr2, Ser3,AzaGly7, Arg (Me)9]MS10	1104.1	1104.6	19	a	H

[0934]

TABLE 6

240	des(1)-[D-Tyr2, Ile3,AzaGly7, Arg (Me)9]MS10	1130.1	1130.6	20.3	a	H
241	des(1)-[D-Tyr2, Thr3,Aza Gly7,Arg (Me)9]MS10	1188	1118.6	20.3	a	H
242	des(1)-[D-Tyr2, D-Trp3,Aza Gly7, Arg(Me)9]MS10	1202.9	1203.6	21.2	a	H
244	[D-Tyr1,Phe3, AzaGly7,Arg (Me)9] MS10	1278.6	1278.6	10.5	c	H
245	[D-Tyr1,Nal (1)3,AzaGly7, Arg(Me) 9]MS10	1328.5	1328.7	12.3	c	H
246	[D-Tyr1,Nal (2)3,AzaGly7, Arg(Me) 9]MS10	1328.7	1328.7	12.3	c	H
247	[D-Tyr1,Phe (2Cl)3,AzaGly7, Arg (Me)9]MS10	1315.6	1312.6	11.3	c	H
248	[D-Tyr1,Phe (3Cl)3,AzaGly7, Arg (Me)9]MS10	1312.5	1312.6	11.6	c	H
249	[D-Tyr1,Phe (4Cl)3,AzaGly7, Arg (Me)9]MS10	1312.5	1312.6	11.7	c	H
250	[D-Tyr1,Phe (4NH ₂) ₃ ,Aza Gly7,Arg (Me)9]MS10	1293.4	1293.6	7.8	c	H
251	[D-Tyr1,Pya (3)3,AzaGly7, Arg(Me) 9]MS10	1279.4	1279.6	7.8	c	H

TABLE 6-continued

252	[D-Tyr1,D-Ala3, AzaGly7, Arg(Me) 9]MS10	1202.4	1202.6	8.5	c	H
253	[D-Tyr1,Pro3, AzaGly7,Arg (Me)9] MS10	1228.4	1228.6	8.6	c	H
254	des(1)-[D-Tyr2, Phe3,Aza Gly7,Arg (Me)9]MS10	1164.4	1164.6	11.8	c	H
255	des(1)-[D-Tyr2, Nal(2)3,Aza Gly7,Arg (Me)9]MS10	1214.5	1214.6	13.7	c	H
256	des(1)-[D-Pya (3)2,Phe3,Aza Gly7,Arg (Me)9]MS10	1149.3	1149.6	9.5	c	H

[0935]

TABLE 7

257	[D-Tyr1,D-Asn2, Phe3,Aza Gly7,Arg(Me) 9]MS10	1278.5	1278.6	10.9	c	H
258	[D-Pya(3)1,Aza Gly7,Arg (Me)9] MS10	1302.3	1302.6	10.1	c	H
259	[D-Ala1,Aza Gly7,Arg(Me) 9]MS10	1225.5	1225.6	10.7	c	H
260	des(1-3)-3-(3- Indolyl)propionyl- [AzaGly7, Arg(Me)9]MS10	1025.2	1025.5	13.7	c	I
261	[7Ψ8,CH ₂ NH] MS10	1288.1	1288.7	17.2	a	D
265	des(1-3)-Indole- 3-carbonyl- [AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	997.3	997.5	12.6	c	I
266	des(1-3)-Indole- 3-acetyl- [AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1011.3	1011.5	12.7	c	I
267	des(1-3)-4-(3- Indolyl)butyryl- [AzaGly7, Arg (Me)9]MS10	1039.3	1039.5	14.4	c	I
268	des(1-3)-Diphenylacetyl- [AzaGly7, Arg (Me)9]MS10	1048.5	1048.5	15.7	c	I
269	des(1-3)-3-Phenylpropionyl- [AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	986.7	986.5	13.5	c	I
270	[D-Tyr1Phe3, Ser-Phe5, AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1425.5	1425.7	13.4	c	H
271	des(1-2)-[Aza Gly7,Arg(Me) 9]MS10	1040.2	1040.5	10.4	c	H
272	des(1-2)-Acetyl- [AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1082.3	1082.6	12.8	c	H

TABLE 7-continued

273	des(1-2)-Amidino- [AzaGly7, Arg(Me)9] MS10	1082.3	1082.6	11.4	c	J
274	des(1-2)-Acetyl [Ala3,AzaGly7, Arg(Me)9] MS10	967.3	967.5	9.6	c	H
275	des(1-2)-Acetyl [Arg3,AzaGly7, Arg(Me)9] MS10	1052.2	1052.6	8.5	c	H
276	des(1-2)-Acetyl [Thr3,AzaGly7, Arg(Me)9] MS10	997.2	997.5	9.4	c	H
277	des(1-3)-n-Hexanoyl- [AzaGly7, Arg(Me)9] MS10	952.2	952.5	13.4	c	I

[0936]

TABLE 8

278	des(1-3)-Cyclo hexanecarbonyl [AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	964.3	964.5	13.2	c	I
279	des(1-3)-2- (Indol-3-yl) ethylcarbamoyl- [AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1040.2	1040.5	20.1	a	J
281	[D-Tyr1,Pyra (2)6,Arg(Me)9] MS10	1317.3	1317.6	7.8	c	E
282	[D-Tyr1,Pyra (4)6,Arg(Me)9] MS10	1317.2	1317.6	8	c	E
283	[D-Tyr1,D-Asn2, Cha3-AzaGly7, Arg(Me)9] MS10	1284.3	1284.7	12.3	c	H
284	[D-Tyr1,D-Asn2, Thr3,AzaGly7, Arg(Me)9]MS10	1232.2	1232.6	8.6	c	H
285	[D-Tyr1,Pyra(2) 3,AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1279.2	1279.6	7.9	c	H
286	[D-Tyr1,Pyra(4) 3,AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1279.2	1279.6	7.7	c	H
287	[D-Tyr1,D-Ser2, AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1290.1	1290.6	11.4	c	H
288	[D-Tyr1,D-His2, AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1340.2	1340.7	10.3	c	H
289	des(1)-[D-Pyra (3)2,AzaGly7, Arg(Me)9]MS10	1188.2	1188.6	10	c	H
290	[D-Pyra(3)1,D- Asn2,Cha3, AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1269.5	1269.7	10.9	c	H
291	[D-Pyra(3)1,D- Tyr2,Cha3, AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1317.4	1318.7	12	c	H
293	[4Ψ5,CH ₂ NH] MS10	1288.1	1288.7	18.4	a	D

TABLE 8-continued

294	[1Ψ2,CH ₂ NH] MS10	1288.4	1288.7	19.2	a	D
295	[2Ψ3,CH ₂ NH] MS10	1288.1	1288.7	18.2	a	D
296	[6Ψ7,CSNH, D-Tyr1,Arg (Me)9] MS10	1332.1	1332.6	20.5	a	F
297	[D-Tyr1,Thr5, AzaGly7,Arg (Me)9] MS10	1331.2	1330.7	11.3	c	H
298	[D-Tyr1,D-Asn2, Thr5,AzaGly7, Arg(Me) 9]MS10	1331.1	1330.7	11.6	c	H

[0937]

TABLE 9

299	[1Ψ2,CH ₂ NH, AzaGly7,Arg (Me)9] MS10	1303.4	1330.7	11.3	c	D + H
300	[1Ψ2,CH ₂ NH, D-Trp3,Aza Gly7,Arg (Me)9]MS10	1303.4	1303.7	10.8	c	D + H
301	[D-Tyr1,Ala (2-Qui)3,Aza Gly7,Arg (Me)9]MS10	1329.4	1329.6	9	c	H
302	[D-Tyr1,D-Pya (4)3,AzaGly7, Arg (Me)9]MS10	1279.4	1279.6	7.6	c	H
303	[D-Tyr1,D-Asn2, Pya(4)3, AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1279.4	1279.6	7.6	c	H
304	[D-Asn2,Pya (4)3,AzaGly7, Arg(Me)9] MS10	1279.4	1279.6	7.7	c	H
305	des(1)-[D-Tyr2, D-Pya(4)3, AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1165.4	1165.6	8	c	H
306	[D-Pya(4)1,D- Asn2,Cha3, AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	1269.5	1269.5	10.8	c	H
307	[7Ψ8,CH ₂ NH, D-Tyr1,Arg (Me)9] MS10	1302.2	1302.7	17.9	a	D + E
308	[6Ψ7,CH ₂ NH, D-Tyr1,Arg (Me)9] MS10	1302.3	1302.7	18.1	a	D + E
310	[Nar9]MS10	1288.8	1288.6	19.4	a	E
311	[Nar(Me)9]MS10	1302.3	1302.6	19.5	a	E
312	[Har(Me)9]MS10	1330.2	1330.7	19.5	a	E
313	[Dab9]MS10	1246.1	1246.6	19.3	a	A
314	[Orn9]MS10	1260.2	1260.6	19.3	a	A
315	des(1)-[D-Asn2, Cha3,Aza Gly7,Arg(Me) 9]MS10	1121.3	1121.6	11.4	c	H
316	[D-Tyr1,D-Asn2, Thr3,Aza	1250.5	1250.6	17	a	H

TABLE 9-continued

	Gly7,Arg(Me) 9,Phe(4F)10] MS10					
317	[D-Tyr1,D-Asn2, Pya(4)3, AzaGly7,Arg (Me)9,Phe(4F) 10]MS10	1297.4	1297.6	16.4	a	H
318	[D-Tyr1,Aza Gly7,Arg(Me) 9,Phe (4F)10]MS10	1335.4	1335.6	19	a	H

[0938]

TABLE 10

319	[6Ψ7,NHCO, D-Tyr1,Arg (Me)9] MS10	1316.3	1316.7	18.7	a	K
322	des(1-3)-3-Pyridylpropionyl- [AzaGly7, Arg(Me)9] MS10	987.4	987.5	8.09	c	I
323	des(1-3)-4-Imidazoleacetyl- [AzaGly7, Arg(Me)9]MS10	962.5	962.5	7.87	c	I
324	des(1-3)-4-Piperidinecarbonyl- [AzaGly7,Arg (Me)9]MS10	965.5	965.5	7.69	c	I
325	des(1-3)-1-Piperidineacetyl- [AzaGly7, Arg(Me)9]MS10	979.5	979.5	8.52	c	I
326	des(1-3)-1-Methylpiperidinio- 1- acetyl-[AzaGly7, Arg(Me) 9]MS10	993.4	993.6	8.71	c	I
327	des(1-3)-1-Pyridinioacetyl- [Aza Gly7,Arg(Me) 9]MS10	973.4	973.5	8.09	c	I
328	des(1-3)-D-Glucronyl- [Aza Gly7, Arg(Me)9]MS10	1030.2	1030.5	7.46	c	I
375	H ₂ N(CH ₂) ₂ Gly-[D-Tyr1, Arg(Me)9]MS10	1416.4	1416.7	17.3	a	E
385	des(1)-[D-Tyr2, D-Pya(4)3, AzaGly7,Arg (Me)9,Trp10] MS10	1204.4	1204.6	8.3	c	H
386	des(1-3)-3-Pyridylpropionyl- [AzaGly7, Arg(Me)9, Trp10]MS10	1026.4	1026.2	8.5	c	I
387	Dap-[D-Tyr1, Arg(Me)9]MS10	1402.7	1402.7	17.0	a	E
397	MeNHCS-Sar- [D-Tyr1,Arg (Me)9]MS10	1461.2	1460.7	20.0	a	E
400	(S)-1-(Quinolin- 8-yl-carbamoyl)- 4-thiapentylcarbamoyl- [D-Tyr1, Arg(Me)9] MS10	1617.9	1617.7	21.7	a	E

a: 0-70%
AcCN/35 min,

TABLE 10-continued

flow1 ml/min,
Wakosil-II
5C18
HG(4.6 × 100 mm)
b: 0-70%
AcCN/35 min,
flow1 ml/min,
YMC ODS
AM-301(4.6 × 100 mm)

[0939]

TABLE 11

c: 20-70%
AcCN/25 min,
flow1 ml/min,
YMC ODS
AM-301(4.6 × 100 mm)
d: 5-55%
AcCN/25 min,
flow1 ml/min,
Wakosil-II
5C18
HG(4.6 × 100 mm)
Compound No. 1
alone shows M⁺
value.

Formulation Example 1

[0940]

(1) Compound No. 305	10.0 mg
(2) Lactose	60.0 mg
(3) Cornstarch	35.0 mg
(4) Gelatin	3.0 mg
(5) Magnesium stearate	2.0 mg

[0941] A mixture of 10.0 mg of Compound No. 305, 60.0 mg of lactose and 35.0 mg of cornstarch is passed through a sieve of 1 mm mesh for granulation, using 0.03 ml of 10% aqueous gelatin solution (3.0 mg as gelatin). The granules are dried at 40° C. and sieved again. The granules thus obtained are mixed with 2.0 mg of magnesium stearate and compressed. The resulting core tablets are coated with sugar-coating of an aqueous suspension of sucrose, titanium dioxide, talc and gum arabic. The coated tablets are polished with yellow beeswax to obtain coated tablets.

Formulation Example 2

[0942]

(1) Compound No. 305	10.0 mg
(2) Lactose	70.0 mg
(3) Cornstarch	50.0 mg
(4) Soluble starch	7.0 mg
(5) Magnesium stearate	3.0 mg

[0943] A mixture of 10.0 mg of Compound 305 and 3.0 mg of magnesium stearate is granulated in 0.07 ml of an

aqueous solution of a soluble starch (7.0 mg as soluble starch). The granules are dried, and mixed with 70.0 mg of lactose and 50.0 mg of cornstarch. The mixture is compressed to obtain tablets.

Formulation Example 3

[0944]

(1) Compound No. 305	5.0 mg
(2) Table salt	20.0 mg
(3) Distilled water to make the whole volume	2 ml

[0945] After 5.0 mg of Compound No. 305 and 20.0 mg of table salt are dissolved in distilled water, water is added to the solution to make the whole volume 2.0 ml. The solution is filtered and the filtrate is filled in a 2 ml ampoule under aseptic conditions. The ampoule is sterilized and sealed to obtain a solution for injection.

Test Example 1

Assay for hOT7T175 Receptor Binding Activity

(1) Preparation of Cy-5-Labeled Metastin (40-54)

[0946] A synthetic peptide having the 40-54 amino acid sequence in the amino acid sequence of the metastin, wherein Cy-5 was introduced via the ϵ -amino group of lysine located at the amino terminus and the carboxyl terminus was further amidated, was prepared in accordance with the synthesis technique of Amersham Bioscience, Inc. Using this synthetic peptide, a test for binding inhibition was carried out. Sequence: (Cy-5)-KDLPNYNWNSFGLRF-NH₂

(2) Test for Binding Inhibition Using a Test Compound, Cy-5-Labeled Metastin (40-54) and hOT7T175-Expressed CHO Cell

[0947] hOT7T175-Expressed CHO cells were cultured in MEM- α medium (nucleic acid-free) containing 10% dialyzed serum. The medium was removed and the adherent cells were washed with PBS. Then, PBS containing 5 mM EDTA was added and the cells were scraped from a flask with a cell scraper. After centrifugation, the cells were suspended at 1.11×10^5 cells/ml in assay buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , 3 mM MgCl_2 , 0.5% BSA, 0.01% NaN_3) and Cy-5-labeled metastin (40-54) was added to the suspension in a final concentration of 1 nM. To each well of a 96-Well Black Clear Bottom Plate (Applied Biosystems, Inc.), 10 μL of assay buffer containing 1% dimethylsulfoxide was added to examine total binding, 10 μL of 10 μM non-labeled peptide (having the same amino acid sequence as that of the labeled one) solution diluted with assay buffer to examine non-specific binding, and 10 μL of a test compound diluted with assay buffer to examine the binding inhibition activity of the test compound, respectively. Furthermore, 90 μL each of the cell suspension was dispensed to each well. An hour after, the level of Cy-5-labeled metastin (40-54) bound to the cells was determined by the FMAT 8100 HTS system (Applied Biosystems, Inc.). The specific binding is a value obtained by subtracting the non-specific binding from the total binding. The binding inhibition activity of each test compound is shown by a ratio of the value obtained by subtracting a value found in the presence of a test compound from the total binding, to the specific binding. The receptor binding activity of each test compound is shown in TABLES 11 through 17.

TABLE 12

Compd. No.	IC_{50} (M)
1 Metastin	1.7E-07
3 MS10	6.5E-09
4 des(1)-MS10	2.6E-07
17 [Pya(4)10]MS10	6.6E-12
18 [Tyr(Me)10]MS10	7.7E-09
19 [Phe(2F)10]MS10	8.6E-09
23 [Tyr5]MS10	4.0E-07
24 [Leu5]MS10	8.3E-10
30 Acetyl-MS10	3.1E-08
31 Fmoc-MS10	9.3E-07
32 Leu-Pro-Asn-MS10	2.5E-08
39 [D-Asn4]MS10	8.3E-07
40 [D-Trp3]MS10	1.9E-08
41 [D-Asn2]MS10	2.1E-07
42 [D-Tyr1]MS10	5.7E-08
44 [Lys9]MS10	1.9E-07
50 [Ala7]MS10	1.9E-07
54 des(1-2)-Fmoc-MS10	4.5E-07
57 [Asp2]MS10	1.0E-07
58 [Tyr2]MS10	1.6E-08
59 [Leu2]MS10	3.4E-07
60 [Pya(3)10]MS10	1.7E-07
61 [Phe(4F)10]MS10	1.3E-08
67 [Ala3]MS10	2.7E-08
68 [Leu3]MS10	7.7E-09
69 [Ser3]MS10	8.3E-08
70 [Asp3]MS10	2.0E-07
71 [Lys3]MS10	6.6E-08
72 [Ala1]MS10	5.4E-07
73 [Leu1]MS10	2.2E-07
75 [Asp1]MS10	8.8E-07

[0948]

TABLE 13

77 [Phe(4CN)10]MS10	7.4E-09
78 [Trp(CHO)3, Phe(4CN)10]MS10	2.5E-08
82 [Arg(Me)9]MS10	4.1E-09
83 [Arg(Me) ₂ asy9]MS10	2.5E-08
97 [Har9]MS10	3.7E-07
101 [Ser7]MS10	1.0E-07
105 [Nle8]MS10	8.8E-07
107 [Val8]MS10	1.2E-07
109 [Tyr10]MS10	2.3E-08
110 [Nal(2)10]MS10	2.4E-08
111 [Phe(F ₃)10]MS10	1.4E-07
112 [Cha10]MS10	3.7E-07
114 des(1-3)-3-(3-Indolyl)propionyl-MS10	5.5E-07
128 [10 Ψ ,CSNH]MS10	5.5E-08
129 [Arg(Me) ₂ sy9]MS10	8.3E-08
130 [Phe(4Cl)10]MS10	4.2E-08
131 [Phe(4NH ₂)10]MS10	1.2E-07
132 [Phe(4NO ₂)10]MS10	9.3E-08
133 [Nal(1)10]MS10	3.3E-07
134 [Trp10]MS10	1.1E-07
141 [D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	5.1E-08
142 [D-Tyr1,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	2.6E-08
143 [D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	7.7E-09
145 des(1-2)-Fmoc-[Arg(Me)9]MS10	1.2E-07
146 [10 Ψ ,CSNH,D-Tyr1]MS10	3.7E-07
150 [Tyr6]MS10	3.2E-07
151 [Nal(1)6]MS10	3.0E-07
152 [Nal(2)6]MS10	1.8E-07
153 [Phe(F ₃)6]MS10	3.9E-07
154 [Phe(4F)6]MS10	6.0E-08
156 [Cha6]MS10	4.9E-08
163 [6 Ψ 7,CH ₂ NH]MS10	2.5E-07
166 [6 Ψ 7,CSNH]MS10	9.4E-09
169 [D-Tyr1,Ala3,Arg(Me)9]MS10	1.6E-07
170 [D-Tyr1,Ser3,Arg(Me)9]MS10	2.6E-07

[0949]

TABLE 14

171 [D-Tyr1,Cha3,Arg(Me)9]MS10	1.1E-07
174 [D-Tyr1,Arg(Me)9,Trp10]MS10	4.2E-07
176 [AzaGly7]MS10	5.2E-08
181 [D-Tyr1,Cha3,6,Arg(Me)9]MS10	1.9E-08
182 [D-Tyr1,Cha3,6,Arg(Me)9,Trp10]MS10	9.8E-08
186 [Trp(CHO)10]MS10	4.6E-07
187 [Abu8]MS10	7.2E-07
189 [Ala(3-Bzt)10]MS10	2.3E-07
190 [D-Tyr1,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.2E-08
191 [D-Tyr1,Ser3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.0E-07
192 [D-Tyr1,Arg(Et)9]MS10	5.3E-07
193 [D-Tyr1,Arg(n-Pr)9]MS10	9.2E-07
194 [D-Tyr1,Arg(Ac)9]MS10	2.1E-07
197 [Phe(3F)10]MS10	1.7E-07
198 [Phe(3,4F ₂)10]MS10	1.7E-07
199 [Phe(3,4Cl ₂)10]MS10	4.7E-07
200 [Phe(3CF ₃)10]MS10	3.4E-07
201 [Ala(2-Qui)10]MS10	8.2E-07
203 [D-Tyr1,Cha6,Arg(Me)9]MS10	3.7E-08
204 [D-Tyr1,Ala7,Arg(Me)9]MS10	6.8E-07
205 [D-Tyr1,Thr3,Arg(Me)9]MS10	2.6E-07
206 [D-Tyr1,Ile3,Arg(Me)9]MS10	8.5E-08
208 [D-Tyr1,Thr4,Arg(Me)9]MS10	8.3E-07
210 [D-Tyr1,Ala4,Arg(Me)9]MS10	7.3E-07
211 [D-Tyr1,Thr5,Arg(Me)9]MS10	4.4E-08
212 [D-Tyr1,Ala5,Arg(Me)9]MS10	3.6E-08
213 [D-Tyr1,Val8,Arg(Me)9]MS10	1.9E-07
214 [D-Tyr1,Gln2,Arg(Me)9]MS10	3.9E-07
215 [D-Tyr1,Thr2,Arg(Me)9]MS10	2.5E-07
216 des(1)-[D-Asn2,Arg(Me)9]MS10	7.0E-07
217 des(1)-[D-Tyr2,Arg(Me)9]MS10	2.5E-07
220 [Arg(Et)9]MS10	3.3E-07

TABLE 14-continued

221	[D-Tyr1,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	9.5E-08
222	des(1)-[D-Tyr2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.3E-08
223	des(1-2)-[D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	7.6E-07

[0950]

TABLE 15

224	des(1)-[D-Tyr2,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	1.4E-07
225	des(1)-[D-Asn2,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	4.1E-07
226	des(1)-[D-Tyr2,Ser3,Arg(Me)9]MS10	1.0E-07
227	des(1)-[D-Tyr2,Thr3,Arg(Me)9]MS10	4.8E-08
228	des(1)-[D-Tyr2,Ile3,Arg(Me)9]MS10	4.0E-08
229	[D-Tyr1,Val3,Arg(Me)9]MS10	1.3E-07
230	[D-Tyr1,D-Asn2,Arg(Me)9]MS10	2.5E-07
231	[D-Tyr1,D-Asn2,D-Trp3,Arg(Me)9]MS10	5.5E-08
232	[D-Tyr1,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.9E-08
233	[D-Tyr1,Ile3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.3E-08
234	[D-Tyr1,Val3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.7E-08
235	[D-Tyr1,Ala3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.0E-07
236	[D-Tyr1,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.2E-08
237	[D-Tyr1,D-Asn2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.7E-08
238	[D-Tyr1,D-Asn2,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.9E-08
239	des(1)-[D-Tyr2,Ser3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.2E-07
240	des(1)-[D-Tyr2,Ile3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.7E-08
241	des(1)-[D-Tyr2,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.6E-08
242	des(1)-[D-Tyr2,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	7.0E-08
244	[D-Tyr1,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	7.7E-08
245	[D-Tyr1,Nal(1)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	9.8E-08
246	[D-Tyr1,Nal(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	7.1E-09
247	[D-Tyr1,Phe(2C)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.5E-08
248	[D-Tyr1,Phe(3C)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.8E-08
249	[D-Tyr1,Phe(4C)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.5E-07
250	[D-Tyr1,Phe(4NH ₂)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.7E-09
251	[D-Tyr1,Pyra(3)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	8.7E-08
252	[D-Tyr1,D-Ala3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.8E-07
253	[D-Tyr1,Pro3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.7E-08
254	des(1)-[D-Tyr2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.1E-08
255	des(1)-[D-Tyr2,Nal(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.3E-08
256	des(1)-[D-Pya(3)2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.2E-08
257	[D-Tyr1,D-Asn2,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.0E-08
258	[D-Pya(3)1,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	9.0E-08
259	[D-Ala1,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.5E-07

[0951]

TABLE 16

260	des(1-3)-3-(3-Indolyl)propionyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.2E-07
261	[7y8,CH ₂ NH]MS10	3.9E-07
265	des(1-3)-Indole-3-carboxyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	9.5E-08
266	des(1-3)-Indole-3-acetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.3E-07
267	des(1-3)-4-(3-Indolyl)butyryl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.6E-07
268	des(1-3)-Diphenylacetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.5E-07
269	des(1-3)-3-Phenylpropionyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.7E-07
270	Endo-Phe5a-[D-Tyr1,Phe3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.5E-08
271	des(1-2)-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.2E-07
272	des(1-2)-Acetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.4E-07
273	des(1-2)-Amidino-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.0E-07
275	des(1-2)-Acetyl-[Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.1E-07
276	des(1-2)-Acetyl-[Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.8E-07
277	des(1-3)-n-Hexanoyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.4E-08
278	des(1-3)-Cyclohexanecarbonyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.1E-07
279	des(1-3)-2-(Indol-3-yl)ethylcarbamoyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.9E-08

TABLE 16-continued

281	[D-Tyr1,Pyra(2)6,Arg(Me)9]MS10	2.3E-07
283	[D-Tyr1,D-Asn2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	6.9E-10
284	[D-Tyr1,D-Asn2,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.4E-08
285	[D-Tyr1,Pyra(2)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.0E-08
286	[D-Tyr1,Pyra(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.7E-08
287	[D-Tyr1,D-Ser2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.3E-09
288	[D-Tyr1,D-His2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	7.2E-11
289	[D-Pya(3)2,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10-(2-10)	8.4E-09
290	[D-Pya(3)1,D-Asn2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.4E-09
291	[D-Pya(3)1,D-Tyr2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.1E-10
294	[1y2,CH ₂ NH]MS10	3.0E-08
295	[2y3,CH ₂ NH]MS10	6.8E-07
296	[6y7,CSNH,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	1.4E-08
297	[D-Tyr1,Thr5,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	9.3E-10
298	[D-Tyr1,D-Asn2,Thr5,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.5E-10
299	[1Ψ2,CH ₂ NH,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.2E-09
300	[1Ψ2,CH ₂ NH,D-Trp3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	3.8E-09
301	[D-Tyr1,Ala(2-Qui)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.5E-08

[0952]

TABLE 17

302	[D-Tyr1,D-Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	7.7E-09
303	[D-Tyr1,D-Asn2,Pyra(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.0E-10
304	[D-Asn2,Pyra(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.0E-09
305	des(1)-[D-Tyr2,D-Pya(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	1.3E-09
306	[D-Pya(4)1,D-Asn2,Cha3,AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.4E-09
307	[7Ψ8,CH ₂ NH,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	6.4E-08
308	[6Ψ7,CH ₂ NH,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	3.5E-07
310	[Nar9]MS10	3.1E-07
311	[Nar(Me)9]MS10	4.7E-07
312	[Har(Me)9]MS10	1.0E-07
313	[Dab9]MS10	6.9E-07
314	[Om9]MS10	4.7E-07
316	[D-Tyr1,D-Asn2,Thr3,AzaGly7,Arg(Me)9,Phe(4F)10]MS10	2.6E-08
317	[D-Tyr1,D-Asn2,Pyra(4)3,AzaGly7,Arg(Me)9,Phe(4F)10]MS10	2.1E-09
318	[D-Tyr1,AzaGly7,Arg(Me)9,Phe(4F)10]MS10	9.9E-10
319	[6Ψ7,NHCO,D-Tyr1,Arg(Me)9]MS10	9.7E-09
322	des(1-3)-3-Pyridylpropionyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	5.4E-08
323	des(1-3)-4-Imidazolacetyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	2.8E-07
328	des(1-3)-D-Glucuronyl-[AzaGly7,Arg(Me)9]MS10	4.7E-07

Test Example 2

Assay for Intracellular Ca Ion Level-Increasing Activity Using FLIPR

[0953] In accordance with the method described in JPA 2000-312590, the intracellular Ca ion level-increasing activity was measured using FLIPR.

[0954] The stable expression cell line hOT7T175 was acquired by transduction of expression plasmid pAK-rOT175 for animal cells into CHO/dhfr⁻ cells, using CellPect Transfection Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.). First, 240 μL of Buffer A (attached to CellPect Transfection Kit) was added to 9.6 μg of plasmid DNA dissolved in 240 μL of distilled water, followed by stirring. After settling the mixture for 10 minutes, 480 μL of Buffer B (attached to CellPect Transfection Kit) was added to the mixture, which was vigorously stirred to form DNA-containing liposomes. Then, 4×10⁵ CHO/dhfr⁻ cells (obtained from ATCC) were inoculated on a 60 mm Petri dish. After

culturing the cells in Ham's F-12 medium (Nissui Seiyaku Co., Ltd.) supplemented with 10% fetal bovine serum (BIO WHITTAKER, Inc.) at 37° C. for 2 days in 5% carbon dioxide gas, 480 μ L of the liposomes were dropwise added to the cells in the Petri dish. After culturing the cells at 37° C. for 6 hours in 5% carbon dioxide gas, the cells were washed twice with serum-free Ham's F-12 medium and 3 ml of 15% glycerol was added to the cells in the Petri dish to treat for 2 minutes. The cells were again washed twice with serum-free Ham's F-12 medium followed by incubation in Ham's F-12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37° C. for 15 hours in 5% carbon dioxide gas. The cells were dispersed by trypsin treatment and recovered from the Petri dish. The recovered cells were inoculated on a 6-well plate in 1.25×10^4 cells/well and incubation was initiated at 37° C. in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) medium (Nissui Seiyaku Co., Ltd.) containing 10% dialyzed fetal bovine serum (JRH BIOSCIENCES, Inc.) under 5% carbon dioxide gas. The plasmid-transfected CHO transformants grew in the medium but the non-transfected cells gradually died. The medium was exchanged on Days 1 and 2 to remove the cells died. Approximately 20 colonies of the CHO transformants that kept growing on Days 8 to 10 after the incubation were isolated. From the cells in these colonies, cells showing high reactivity with the ligand peptide metastin (hereinafter merely referred to as hOT7T175/CHO) were selected to provide for the following experiment.

[0955] The intracellular Ca ion level-increasing activity of the synthetic peptide in hOT7T175/CHO was determined using FLIPR (Molecular Devices, Inc.).

[0956] hOT7T175/CHO was subcultured in DMEM supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum (hereinafter abbreviated as dFBS) and provided for the experiment (hereinafter abbreviated as 10% dFBS/DMEM). The hOT7T175/CHO was suspended in 10% dFBS-DMEM in 15×10^4 cells/ml. The suspension was inoculated on a 96-well plate for FLIPR (Black Plate Clear Bottom, Coster, Inc.) at 200 μ L each (3.0×10^4 cells/200 μ L/well), followed by incubation at 37° C. overnight in a 5% CO₂ incubator (hereinafter simply referred to as the cell plate). Then, 21 ml of HANKS/HBSS (9.8 g of HANKS, 0.35 g of sodium hydrogencarbonate, 20 ml of 1M HEPES; after adjusting the pH to 7.4 with 1N sodium hydroxide, the mixture was sterilized by filtration), 210 μ L of 250 mM Probenecid and 210 μ L of fetal bovine serum (FBS) were mixed (HANKS/HBSS-Probenecid-FBS).

[0957] Furthermore, 2 vials of Fluo3-AM (50 μ g/vial) were dissolved in 21 μ L of dimethylsulfoxide and 21 μ L of 20% Pluronic acid. The resulting solution was added to and mixed with 10 ml of HANKS/HBSS-Probenecid-FBS described above. After the culture medium was removed, the mixture was dispensed onto the cell plate in 100 μ L each/well, followed by incubation at 37° C. for an hour in a 5% CO₂ incubator (pigment loading). The peptide was dissolved in dimethylsulfoxide in 1×10^{-3} M. The peptide solution was diluted with HANKS/HBSS containing 2.5 mM Probenecid, 0.2% BSA and 0.1% CHAPS. The dilution was transferred to a 96-well plate for FLIPR (V-Bottom plate, Coster, Inc.) (hereinafter referred to as a sample plate). After completion of the pigment loading onto the cell plate, the cell plate was washed 4 times with wash buffer, which was obtained by adding 2.5 mM Probenecid to HANKS/HBSS, using a plate

washer. After the washing, 100 μ L of wash buffer was left. The cell plate and the sample plate were set in FLIPR and 0.05 ml of a sample from the sample plate was automatically transferred to the cell plate with the FLIPR device to promote the cell response. A change in intracellular calcium ion level for 180 seconds was measured with passage of time. Tables 18 through 22 show the intracellular Ca ion level-increasing activity [expressed by a specific activity to metastin (1-54)].

TABLE 18

Compd. No.	Specific Activity
Metastin (1-54)	1
Metastin (45-54)	10
17	5
18	1
19	2
24	1
30	10
31	2
32	10
40	30
41	10
42	30
45	1
50	30
53	1
54	5
55	5
56	1
74	1
75	1
76	1
78	10
79	1
87	1
88	1
97	10
98	1/2
101	10
105	1
109	20
110	20
111	3
112	2
114	3

[0958]

TABLE 19

128	10
130	10
131	3
132	10
133	3
134	30
141	10
142	2
143	3
144	1
146	10
151	1
152	5
154	5
156	2
163	1
166	5
169	2
170	1
171	10
172	1

TABLE 19-continued

173	1
174	10
176	5
182	5
187	1
189	10
190	10
192	1
193	001
194	1
187	10
198	10
199	3
200	10

[0959]

TABLE 20

201	1
203	10
204	5
205	10
206	10
207	½
208	1
209	½
210	1
211	10
212	10
213	2
214	10
215	10
216	1
217	20
220	5
222	5
224	2
224	1
224	1
224	1
228	5
229	1
230	10
231	1
232	3
233	1
234	1
235	1
236	2
237	3
238	1
241	1
242	2

[0960]

TABLE 21

244	1
245	1
246	2
247	1
248	2
249	1
250	1
254	1
255	1
256	1
257	3
258	2

TABLE 21-continued

259	1
260	5
261	1
265	3
266	2
267	2
268	1
269	3
270	1
271	1
272	2
273	5
274	1
277	2
278	2
279	5
281	½
284	1
286	2
287	2
288	1
289	1
290	1

[0961]

TABLE 22

291	2
294	10
295	1
296	3
297	1
298	5
299	5
300	5
301	1
302	2
303	5
304	3
305	5
306	2
307	1
308	2
310	3
311	1
312	3
314	1
315	1
316	1
317	1
318	5
319	3
322	1
323	1
375	2
385	10
386	7
387	1
397	5

Test Example 3

Assay for Cell Growth Inhibition Activity in hOT7T175-Expressed CHO Cells

[0962] hOT7T175-Expressed CHO cells (hereinafter hOT7T175) were cultured in DMEM supplemented with 10% dialyzed FBS (hereinafter 10% dFBS/DMEM), which was used for the following assay. The hOT7T175 was suspended in 10% dFBS/DMEM at 10,000 cells/ml. The

cells were plated on a 96 well plate at 100 μ L each/well (1,000 cells/well), followed by culturing overnight at 37° C. in a 5% CO₂ incubator. On the following day, the medium was removed and 90 μ L of 10% dFBS/DMEM supplemented with 0.5% BSA (hereinafter, 0.5% BSA/10% dFBS/DMEM) was added. Subsequently, 10 μ L of a solution of metastin or a metastin derivative in 0.5% BSA/10% dFBS/DMEM was added to each well, followed by culturing at 37° C. in a 5% CO₂ incubator for 3 days. After 10 μ L of Cell Counting Kit-8 solution (Dojin Chemical Laboratory) was added to each well, incubation was performed at 37° C. in a 5% CO₂ incubator for 4 hours and absorbance was measured at 450 nm.

[0963] The cell inhibition activities of Metastin (1-54), Metastin (45-54) and synthetic compound are shown in Table 23.

TABLE 23

Compd. No.	IC ₅₀ (M)
305	8.94E-09
232	9.67E-09
286	1.83E-08
303	4.12E-08
322	7.19E-08
141	8.70E-08
1-54	2.12E-07
45-54	8.51E-06

*Numerals 1-54 and 45-54 denote Metastin (1-54) and Metastin (45-54), respectively.

Test Example 4

Assay for Chemotaxis Inhibition Activity in hOT7T175-Expressed CHO Cells

[0964] The hOT7T175-expressed CHO cells (hereinafter hOT7T175) were cultured in DMEM supplemented with 10% dialyzed FBS (hereinafter 10% dFBS/DMEM), which was provided for assay. Also, a 24-well 6.5 mm Transwell (pore size of 8.0 μ m) (COSTAR) was treated with fibronectin by the following method. Specifically, 0.5 ml of 1 μ g/ml bovine fibronectin (Yagai Co., Ltd.) was added to the upper and lower chambers of Transwell. After settling the mixture at room temperature for 10 minutes, the fibronectin solution was removed and further air-dried. After washing with DMEM 3 times, hOT7T175 was suspended in DMEM containing 0.5% BSA (hereinafter 0.5% BSA/DMEM) at a density of 2.5×10^6 cells/ml. Metastin or a metastin derivative was diluted with 0.5% BSA/DMEM. After 600 μ L of 0.5% BSA/DMEM supplemented with 20% FBS (or 0.5% BSA/DMEM for negative control) was added to the lower chamber of Transwell, and 50 μ L of the cell suspension and 50 μ L of the metastin or a metastin derivative dilution (or 0.5% BSA/DMEM for positive control) were added to the upper chamber. After incubation at 37° C. in a 5% CO₂ incubator for 7 hours, the culture medium was removed and the upper side of the filter was wiped with a cotton swap wetted with phosphate-buffered saline to remove all cells on the upper side of the filter. The filter was fixed and stained with DifQuick (International Reagents Corporation) and the cells migrated toward the lower side of the filter were counted. The chemotaxis inhibition activity is shown in FIG. 1.

Test Example 5

Evaluation of Tumor Growth Inhibition Activity

[0965] The tumor growth inhibition effect of Metastin (1-54) (hereinafter referred to as Metastin) and Compounds (Compound Nos. 305 and 322) in vivo was evaluated using tumor-bearing mice with human colonic carcinoma-derived cell line SW620.

[0966] Alza osmotic pump (0.25 μ L/hour, 14 days release, Model 1002) filled with 100 μ L each of 1 mM Metastin, 0.1 mM and 1 mM Compounds dissolved in distilled water (Otsuka Joryusui K.K.) and distilled water as a vehicle was subcutaneously embedded in the back of BALB/cAnN-nu mice (6 weeks old, female, Charles River Japan, Inc.) under ether anesthesia to initiate continuous administration for 14 days. The number of experiments was n=10 in the Metastin group and the vehicle group and n=11 in the both Compound groups. On the following day, human colonic carcinoma-derived cell line SW620 (ATCC) was dissolved in 20 mM phosphate buffered saline (pH 7.2)(PBS) containing 200 μ L of 0.15M NaCl at a density of 2×10^6 cells. The resulting solution was subcutaneously injected into the left flank of the mice above. The day when the cells were injected was made Day 0. Tumor was measured with an electronic caliper every other or 2 other days during Days 4 to 13 from the cell administration, and tumor size was calculated by the following equation: (shorter diameter)²×longer diameter/2. As shown in FIG. 2, the Metastin group (24 nmol/day/mouse×14 days) showed a significant effect of tumor growth inhibition on Day 6, when compared to the vehicle group. On the other hand, the Compound No. 322 group showed a significant tumor growth inhibition activity in a 1/10 dose (2.4 nmol/day/mouse×14 days) of Metastin from Days 6 to 8. Also, the Compound No. 322 group (24 nmol/day/mouse×14 days) receiving the same dose as that of Metastin showed a significant tumor growth inhibition activity from Days 6 to 11, when compared to the vehicle group and on Day 11, showed a significant tumor growth inhibition activity even when compared with the Metastin group. The foregoing results reveal that Metastin shows the effect of tumor growth inhibition in vivo as well and Compound No. 322 has the effect of tumor growth inhibition by 10 times higher than with Metastin.

[0967] The results of Compound No. 305 are also shown in FIG. 3. The Metastin group (24 nmol/day/mouse×14 days) showed a significant effect of tumor growth inhibition from Days 5 to 7, when compared to the vehicle group. On the other hand, the Compound No. 305 group (2.4 nmol/day/mouse×14 days) receiving a 1/10 dose as that of Metastin showed a significant tumor growth inhibition activity from Days 5 to 11, when compared to the vehicle group. Furthermore, the Compound No. 305 group (24 nmol/day/mouse×14 days) receiving the same dose as that of Metastin showed a significant effect of tumor growth inhibition from Days 5 to 9 and on Day 11, when compared to the vehicle group, revealing that Compound No. 305 also shows the in vivo effect of tumor growth inhibition of 10 times higher than with Metastin.

Test Example 6

Hyperglycemic Effect of Metastin

[0968] In order to study the effect of Metastin on glucose level by peripheral administration, an operation was per-

formed in free moving animal to collect blood. Mature male Wistar rats (weighing 210-230 g at the time of operation) were anesthetized by intraperitoneal injection of 50 mg/kg pentobarbital. The animal was taped dorsally to the dissection pad and the left jugular vein was exposed. A polyethylene tube SP35 (inner diameter of 0.5 mm, outer diameter of 0.9 mm, Natsume Seisakusho Co., Ltd.) was cut into a length of about 30 cm and filled up with 200 units/ml of heparinated saline. The tube was then inserted into the jugular vein to a depth of about 4.5 cm and fixed. The other end of the tube was subcutaneously inserted into the back to expose at the jugular (back).

[0969] After the operation, the animal was maintained overnight. Prior to administration of Metastin, 300 μ l of blood was drawn through a 1 ml tuberculin syringe with a 25-gauge needle (both by Terumo Co., Ltd.). To prevent blood clotting, 3 μ l of 300 KIU/ml aprotinin solution containing 3 mg/ml EDTA had been previously filled in the syringe. Otsuka saline or 1 mL saline solution of Metastin (17, 80 or 170 nmol) was intravenously injected in a dose of 1 mL/kg through the tube. Blood was collected from the jugular vein by 300 μ l each 0, 5, 15, 30 and 60 minutes starting from the intravenous injection. The collected blood was centrifuged (13,000 rpm, 5 minutes) with a high speed refrigerated centrifuge (MR-150, Tomy Seiko Co., Ltd.) to recover the supernatant (plasma). Glucose level in blood was measured using Fuji Drychem 3500 (FUJI FILM). As shown in FIG. 4, the metastin group showed a significant hyperglycemic effect ($p < 0.005$, $n = 5$) in blood dose-dependently (17-170 nmol/kg) from 5 minutes after the intravenous injection, when compared to the control group. In the blood glucose level, a prolonged period of time (30 minutes at maximum) with an increase of the maximum level was noted, as the dose of metastin increased.

Test Example 7

Effect of Promoting Pancreatic Glucagon Secretion by Metastin

[0970] In order to study the mechanism of Metastin for the effect of increasing glucose level in blood, effects of metastin on the level of blood glucagon, insulin, corticosterone and thyroid hormone (T3) known as hormones affecting glucose level in blood were examined. An operation was performed in free moving mature Wistar male rats (weighing 260-3000 g at the time of operation) to collect blood. After the operation, the animal was maintained overnight. Prior to administration of Metastin, 300 μ l of blood was drawn through a 1 ml tuberculin syringe with a 25-gauge needle (both by Terumo Co., Ltd.). To prevent blood clotting, 3 μ l of 300 KIU/ml aprotinin solution containing 3 mg/ml EDTA had been previously filled in the syringe. Otsuka saline or a saline solution of Metastin (80 nmol/mL) was intravenously injected in a dose of 1 mL/kg through the tube. Blood was collected from the jugular vein by 300 μ l each 1, 3, 5 and 15 minutes starting from the intravenous injection. The collected blood was centrifuged (13,000 rpm, 5 minutes) with a high speed refrigerated centrifuge (MR-150, Tomy Seiko Co., Ltd.) to recover the supernatant (plasma). Glucagon level in blood was measured using a glucagon kit "Daiichi" (Daiichi Radioisotope Laboratories Ltd.), insulin level in blood using rat insulin [125 I] assay system (Amersham Biosciences), corticosterone level in blood using rat corticosterone [125 I] assay system (Amersham Biosciences),

thyroid hormone (T3) in blood using T-3.RIA beads (Dinabott Co. Ltd.), and glucose level in blood using Fuji Drychem 3500 (FUJI FILM). As shown in FIG. 5, the Metastin group showed a significant effect of increasing glucagon level in blood 1 minute after the injection, when compared to the control group. The significant effect of increasing glucagon level continued until 5 minutes after the injection. On the other hand, in the blood insulin level (FIG. 6), corticosterone level in blood (FIG. 7) and thyroid hormone (T3) level in blood (FIG. 8), no change was noted by the injection of Metastin. Based on these results and the observed increase in blood glucagon level followed by blood glucose level (FIG. 9), the effect of increasing blood glucose level by intravenous injection of Metastin was considered to be induced by stimulation of glucagon secretion by metastin.

Test Example 8

Hypoglycemic Effect of Metastin Derivatives

[0971] The effect of the metastin derivatives KiSS305 (Compound No. 305) and KiSS322 (Compound No. 322) on blood glucose level and blood glucagon level was examined. An operation was performed in free moving mature Wistar male rats (weighing 260-3000 g at the time of operation) in a manner similar to TEST EXAMPLE 1 to collect blood. After the operation, the animal was maintained overnight. Prior to administration of the metastin, 300 μ l of blood was drawn through a 1 ml tuberculin syringe with a 25-gauge needle (both by Terumo Co., Ltd.). To prevent blood clotting, 3 μ l of 300 KIU/ml aprotinin solution containing 3 mg/ml EDTA had been previously filled in the syringe. Otsuka saline or a saline solution of the metastin (80 nmol/mL) was intravenously injected in a dose of 1 mL/kg through the tube. Blood was collected from the jugular vein by 300 μ l each 2, 5, 15, 30, 45 and 60 minutes starting from the intravenous injection. The collected blood was centrifuged (13,000 rpm, 5 minutes) with a high speed refrigerated centrifuge (MR-150, Tomy Seiko Co., Ltd.) to recover the supernatant (plasma). Glucose level in blood was measured using Fuji Drychem 3500 (FUJI FILM) and glucagon level in blood was measured using a glucagon kit "Daiichi" (Daiichi Radioisotope Laboratories Ltd.), as in TEST EXAMPLE 1 or 2. As shown in FIG. 10, both compounds showed an increase in the blood glucose level. Also, both compounds showed an increase in the blood glucagon level, as shown in FIG. 11.

Test Example 9

Induction of Ovulation by Human Metastin in Immature Rats

[0972] Equine chorionic gonadotropin (eCG, serotropin, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) was dissolved in saline (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) in a concentration of 100 IU/mL. Using a 1 mL tuberculin syringe with a 26-gauge needle (both by Terumo Co., Ltd.), eCG was subcutaneously injected into the dorsal area of female Wistar rats of 23 days old after birth (Charles River Japan, Inc.) in a dose of 10 IU/animal, during 9:30 to 10:00 AM. As shown below, the animal was grouped 47 to 48 hours after the eCG injection and the drugs were injected to these groups, respectively.

[0973] Group A (5 rats): Human chorionic gonadotropin (hCG, gonadotropin, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.)

was dissolved in saline at 100 IU/mL and the solution was subcutaneously injected into the back in a dose of 20 IU/animal.

[0974] Group B (5 rats): Human metastin was dissolved in saline at 100 nmol/mL and the solution was subcutaneously injected into the back in a dose of 20 nmol/animal.

[0975] Group C (5 rats): Human metastin was dissolved in saline at 33.3 nmol/mL and the solution was subcutaneously injected into the back in a dose of 6.67 nmol/animal.

[0976] Group D (6 rats): Saline was subcutaneously injected into the back in a dose of 200 μ L/animal.

[0977] After administration of the drugs described above, the animal was sacrificed by decapitation after 24 to 25 hours to recover blood, bilateral oviducts and uterus. In collecting the blood, 90 μ L of 10 KIU/mL aprotinin solution (Trasylol, Bayer) containing 3 mg/mL EDTA had been previously filled in a tube for recovery to prevent blood clotting. After blood recovery, the blood was thoroughly blended and the mixture was centrifuged at 2,000 G for 25 minutes. The supernatant was recovered and used as a plasma sample.

[0978] The number of oocytes was counted as follows.

[0979] Where retained oocytes in the oviducal ampulla were confirmed by stereomicroscopic observation of the oviduct, the ampulla was punctured with a 27-gauge syringe needle (Terumo) to retrieve the oocytes. After granulosa cells surrounding the oocytes were removed by trypsin treatment, the number of oocytes was counted. Where the retained oocytes in the oviducal ampulla were not confirmed by stereomicroscopic observation of the oviduct, a 27-gauge syringe needle with the polished tip was inserted into the tubal ostium and more than 400 μ L of saline was flushed into the oviduct and uterine for rinsing. Then, the presence or absence of oocytes in the effluent was observed.

[0980] The number of oocytes obtained is shown in TABLE 24.

TABLE 24

	Group A	Group B	Group C	Group D
1	36	29	29	0
2	35	56	39	0
3	40	17	32	0
4	42	25	22	0
5	35	32	16	0
Average	37.6	31.8	27.6	0.00
number of				
ova				
Standard	3.21	14.65	8.91	0.00
deviation				

[0981] In the table, numerals 1 to 5 indicate rat identification number.

[0982] In Group A, which is a multipurpose superovulation treatment group, ovulation of 37.6 oocytes in average per rat was confirmed. In Groups B and C receiving the metastin, ovulation of 31.8 and 27.6 oocytes in average, respectively, were confirmed. Turning to Group D receiving saline, the number of oocytes was 0.6 in average, indicating that voluntary ovulation was little observed in the absence of ovulation stimulation.

[0983] The level of estradiol contained in the plasma collected from the rats shown in TABLE 22 was determined by radioimmunoassay (DPC-Estradiol Kit; Diagnostic Products Corporation). The results are shown in FIG. 12.

[0984] The results reveal that among Groups A, B and C, there is no difference in the level of estradiol contained in plasma, showing that the level of estradiol was extremely high only in Group D receiving saline.

[0985] The level of progesterone contained in plasma was determined by radioimmunoassay (DPC.Progesterone; Diagnostic Products Corporation). The results are shown in FIG. 13.

[0986] The results reveal that the level of progesterone was highest in Group A and in Groups B and C, the blood level was approximately half that of Group A and that the progesterone level was extremely low in Group D.

[0987] In general, the major steroid hormone produced in rat mouse and human ovaries is estrogen in the mature phase of ovarian follicle, whereas the hormone is progesterone after ovulation was induced. It is understood actually from the results in FIG. 12 and FIG. 13 that Group D receiving saline maintained the state where estrogen was highly produced, because of no induction of ovulation; whereas in Group A receiving hCG, production of estrogen increased. In Groups B and C, which are groups receiving the metastin, the plasma estrogen level was very low but the level of progesterone increased, indicating that the metastin induced ovulation in the rat ovary via its normal ovulatory process. It is considered that since the progesterone level in Groups B and C was lower than in Group A, the metastin would have a milder ovarian stimulation, when compared to hCG.

Test Example 10

Gonadotropin-Releasing Effect of Human Metastin in Immature Rats

[0988] Human metastin dissolved in saline in a concentration of 33.3 nmol/mL was subcutaneously injected into the dorsal area of female Wistar rats of 25 days old after birth (Charles River Japan, Inc.) in a dose of 200 μ L/animal, i.e., 6.67 nmol as human metastin, during 9:00 to 10:00 AM. Prior to the metastin injection and 1, 2 and 4 hours after the injection, the animal was decapitated to recover blood. In recovery of blood, 90 μ L of 10 KIU/mL aprotinin solution (Trasylol, Bayer) containing 3 mg/mL EDTA had been previously filled in a centrifuging tube for recovery to prevent blood clotting. After blood recovery, the blood was thoroughly blended and the mixture was centrifuged at 2,000 G for 25 minutes. The supernatant was recovered and used as a plasma sample. The levels of FSH (follicle-stimulating hormone), LH (luteinizing hormone) and progesterone contained in the plasma were determined by radioimmunoassay (Rat Follicle Stimulating Hormone (rFSH) [¹²⁵I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation, Rat Luteinizing Hormone (rLH) [¹²⁵I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation, both by Amersham Biosciences, and DPC.Progesterone by Diagnostic Products Corporation).

[0989] The results obtained by monitoring changes in the FSH level in blood from the immature rat by the metastin injection are shown in FIG. 14. One hour after the metastin injection, the blood FSH level began to significantly

increase and reached the maximum after 2 hours. While a decrease in the blood FSH level was noted after 4 hours, the FSH level was still maintained higher than the level prior to the injection.

[0990] The results obtained by monitoring changes in the LH level in blood from the immature rat by the metastin injection are shown in FIG. 15. Similarly to the case of FSH, the blood LH level began to significantly increase 1 hour after and reached the maximum after 2 hours. While a decrease in the blood LH level was noted after 4 hours, the LH level was still maintained higher than the level prior to the injection.

[0991] The results obtained by monitoring changes in the progesterone level in blood from the immature rat by the metastin injection are shown in FIG. 16. Reflecting the increase of blood LH level, the progesterone level began to increase slowly 1 hour after the metastin injection and showed a significantly higher level than the level prior to the injection 2 hours after.

[0992] The results of FIG. 14 and FIG. 15 reveal that peripheral administration of the metastin induces release of gonadotropin such as FSH, LH, etc. The induction of ovulation by the metastin demonstrated in TEST EXAMPLE 9 is considered to be mediated by this gonadotropin release, particularly LH release.

[0993] The effect of inducing ovulation demonstrated in TEST EXAMPLE 9 is an action in rats receiving eCG but the effect in this TEST EXAMPLE shows the results obtained using nude rats. No eCG pretreatment is required for the effect of releasing gonadotropin by the metastin.

[0994] The results shown in FIG. 16 mean that the release of gonadotropin by the metastin injection imparts physiological stimulation also to the ovary, resulting in increasing the production of progesterone.

Test Example 11

Gonadotropin-Releasing Effect of Human Metastin in Mature Male Rats

[0995] Human metastin dissolved in saline in a concentration of 175 nmol/mL was subcutaneously injected into the dorsal area of male Wistar rats of 11 weeks old after birth (Charles River Japan, Inc.) in a dose of 200 μ L/animal, i.e., 35 nmol as human metastin, during 10:30 to 11:30 AM. Prior to the metastin injection and 1, 2 and 4 hours after the injection, the animal was decapitated to recover blood. In recovery of blood, 300 μ L of 10 KIU/mL aprotinin solution (Trasylol, Bayer) containing 3 mg/mL EDTA had been previously filled in a centrifuging tube for recovery to prevent blood clotting. After blood recovery, the blood was thoroughly blended and the mixture was centrifuged at 2,000 G for 25 minutes. The supernatant was recovered and used as a plasma sample. The levels of FSH (follicle-stimulating hormone), LH (luteinizing hormone) and testosterone contained in the plasma were determined by radioimmunoassay (Rat Follicle Stimulating Hormone (rFSH) [¹²⁵I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation, Rat Luteinizing Hormone (rLH) [¹²⁵I] Biotrack Assay System with Magnetic Separation, both by Amersham Biosciences, and DPC. Total Testosterone by Diagnostic Products Corporation).

[0996] The results obtained by monitoring changes in the blood FSH level in rats by the metastin injection are shown in FIG. 17. One hour after the metastin injection, the blood FSH level began to significantly increase and reached the maximum after 2 hours, and even after 4 hours, still maintained a higher state.

[0997] The results obtained by monitoring changes in the blood LH level in rats by the metastin injection are shown in FIG. 18. Similarly to the case of FSH, the blood LH level began to significantly increase 1 hour after and reached the maximum after 2 hours. While a decrease in the blood LH level was noted after 4 hours, the LH level was still maintained higher than the level prior to the injection.

[0998] The results obtained by monitoring changes in the blood testosterone level in rats by the metastin injection are shown in FIG. 19. The testosterone level showed a rapid increase in 1 hour after the metastin injection. While a decrease in the blood testosterone level was noted after 2 and 4 hours, the testosterone level was still maintained at both points of time, which was higher than the level prior to the injection.

[0999] The results of FIG. 17 and FIG. 18 reveal that peripheral administration of metastin induces release of gonadotropin such as FSH, LH, etc. in male rats. In view of the results of TEST EXAMPLE 9, the metastin is considered to be an extremely important factor in both female and male rats, in stimulating the release of gonadotropin.

[1000] The results shown in FIG. 19 mean that the release of gonadotropin by the metastin injection imparts physiological stimulation also to the testis, resulting in increasing the production of testosterone.

[1001] From these results it is considered that administration of metastin would stimulate the testis mediated by release of gonadotropin. This suggests that metastin possibly affects the male reproductive function including seminal maturation, hormone secretion, etc.

Test Example 12

Stability of Compound in Blood

[1002] Blood was drawn from Balb/c mice (female) of 8 weeks old, settled at 37° C. for 30 minutes and centrifuged at 13000 rpm for 10 minutes to give the serum as the supernatant. The serum thus obtained was frozen-stored at -80° C.

[1003] The stability test was performed by addition of 5 nmol of Compound (5 μ L of aqueous solution) to 45 μ L of serum and then settlement of the mixture at 37° C. The settlement was made at 3 points of time, including 2, 10 and 30 minutes. The sample after the settlement was boiled for 3 minutes and cooled on an ice bath. After 200 μ L of acetonitrile/water (3/1) was added to the sample, the mixture was ultrasonicated for 5 minutes and then centrifuged at 5000 rpm for 1 minute. After 150 μ L of the supernatant was diluted with 250 μ L of distilled water, insoluble matters were removed by filtration through a filter having a pore size of 0.45 μ m and 200 μ L of the filtrate was applied on HPLC (220 nm) to determine the peak area of Compound. A ratio of the peak area to the area when Compound was treated for 0 minute under the same conditions was calculated as a mean value in 4 respective runs to determine the residual ratio.

Next, by taking the calculated residual ratio on the ordinate and the time on the abscissa, a graph was prepared and approximated by an exponential function. Thus, the time when the residual ratio reached 50% was determined to be a half life.

[1004] The preparative HPLC used was the LC-VP series manufactured by Shimadzu Corporation and Wakosil-II 5C18 HG (4.6 mm×100 mm) manufactured by Wako Pure Chemical Industries, Ltd. was used as the column. Eluant A (0.1% TFA-containing water) and eluant B (0.1% TFA-containing acetonitrile) were used as eluants. Analysis was performed by linear density gradient elution (25 minutes) at a flow rate of 1.0 ml/min. using eluants A/B: 100/0-0/50.

[1005] the compounds examined in the experiment and the $t_{1/2}$ (min) values are shown in TABLE 25.

TABLE 25

Compound No.	$t_{1/2}$ (min)
1	22.5
3	0.6
42	0.7
82	1.8
134	2.4
141	8.7
232	28.2
286	57.5
296	47.2
305	66.6
308	13.2
319	33.0
322	94.2

Test Example 13

Induction of Ovulation in Immature Rat Using Metastin Derivatives

[1006] Equine chorionic gonadotropin (eCG, serotropin, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) was dissolved in saline (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) in a concentration of 100 IU/mL. Using a 1 mL tuberculin syringe with a 26-gauge needle (both by Terumo Co., Ltd.), eCG was subcutaneously injected into the dorsal area of female Wistar rats of 23 days old after birth (Charles River Japan, Inc.) in a dose of 10 IU/animal, during 9:00 to 10:00 AM. As shown below, the animal was grouped 47 to 48 hours after the eCG injection and the drugs were given to these groups, respectively.

[1007] Group A (5 rats): Human chorionic gonadotropin (hCG, gonadotropin, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) was dissolved in saline at 100 IU/mL and the solution was subcutaneously injected into the back in a dose of 20 IU/animal.

[1008] Group B (5 rats): Compound No. 305 was dissolved in saline at 33.3 nmol/mL and the solution was subcutaneously injected into the back in a dose of 6.7 nmol/animal.

[1009] Group C (5 rats): Compound No. 305 was dissolved in saline at 10.0 nmol/mL and the solution was subcutaneously injected into the back in a dose of 2.0 nmol/animal.

[1010] Group D (5 rats): Compound No. 322 was dissolved in saline at 33.3 nmol/mL and the solution was subcutaneously injected into the back in a dose of 6.7 nmol/animal.

[1011] Group E (5 rats): Compound No. 322 was dissolved in saline at 10.0 nmol/mL and the solution was subcutaneously injected into the back in a dose of 2.0 nmol/animal.

[1012] Group F (6 rats): Saline was subcutaneously injected into the back in a dose of 200 μ L/animal.

[1013] After administration of these drugs, the animal was sacrificed by decapitation after 24 to 25 hours to recover blood, bilateral oviducts and uterus. In collecting the blood, 90 μ L of 10 KIU/mL aprotinin solution (Trasyol, Bayer) containing 3 mg/ml EDTA had been previously filled in a tube for recovery to prevent blood clotting. After blood recovery, the blood was thoroughly blended and the mixture was centrifuged at 2,000 G for 25 minutes. The supernatant was recovered and used as a plasma sample.

[1014] The number of oocytes was counted by referring to the method described in Eur. J. Endocrinol., 138, 594-600 (1998). That is, where retained oocytes in the oviducal ampulla were confirmed by stereomicroscopic observation of the oviduct, the ampulla was punctured with a 27-gauge syringe needle (Terumo) to retrieve the oocytes. After granulosa cells surrounding the oocytes were removed by trypsin treatment, the number of oocytes was counted. Where the retained oocytes in the oviducal ampulla were not confirmed by stereomicroscopic observation of the oviduct, a 27-gauge syringe needle with the polished tip was inserted into the tubal ostium and more than 400 μ L of saline was flushed into the oviduct and uterine for rinsing. Then, the presence or absence of oocytes in the effluent was observed.

[1015] The number of oocytes thus obtained is shown in FIG. 20. In Group A, which is a multipurpose superovulation treatment group, the number of oocytes was 38.0 in average per rat. In Groups B, C and D, the number of oocytes was 32.6, 29.4 and 29.6 oocytes in average, respectively, indicating that ovulation was substantially equivalent to Group A. Turning to Group E receiving 2.0 nmol of Compound No. 322, 3 out of 5 rats were ovulated and the number of oocytes was 11.6 in average, which was less than Group A. Further in Group A for negative control, no ovulation was observed at all.

[1016] The results of FIG. 20 reveal that for induction of ovulation equivalent to hCG, at least 2.0 nmol/animal of Compound No. 305 and at least 6.7 nmol/animal of Compound No. 322 should be administered.

[1017] The results obtained by measuring the level of estradiol contained in plasma are shown in FIG. 21. The level of estradiol in blood was measured by radioimmunoassay (DPC.Estradiol Kit, Iatron, Inc.). As shown in FIG. 21, no difference was found among Groups A, B, C and D in terms of estradiol and only Group F showed a higher level. Group E had a tendency to show a higher level in rats with no ovulation induction.

[1018] The results obtained by measuring the level of progesterone contained in plasma are shown in FIG. 22. The level of progesterone in blood was measured by radioimmunoassay (DPC.Progesterone, Iatron, Inc.). As shown in FIG. 22, the level of progesterone in blood was the highest in Group A and in Groups B, C and D, the progesterone level showed less than a half of the level in Group A. Groups E and F showed a very low level.

[1019] The results of FIG. 21 and FIG. 22 reveal that by administering more than 2.0 nmol/animal of Compound No. 305 and more than 6.7 nmol/animal of Compound No. 322, normal differentiation from estrogen-producing granulosa cells to progesterone-producing luteal cells was induced. Furthermore, when Compound No. 305 or KiSS-322 was administered, the progesterone level was lower than in the hCG administration, suggesting that the stimulating effect of these derivatives on ovary would be milder than that of hCG.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

[1020] The metastin derivative of the present invention, its salts, or prodrugs thereof have excellent blood stability, in addition to excellent cancer metastasis inhibiting action or cancer growth inhibiting action and are useful as agents for preventing/treating cancers (e.g., lung cancer, gastric cancer, liver cancer, pancreatic cancer, colorectal cancer, rectal cancer, colonic cancer, prostate cancer, ovarian cancer, cervical cancer, breast cancer, etc.). The metastin derivative of the present invention, its salts, or prodrugs thereof have an effect of regulating a function of the pancreas and are useful as drugs for preventing/treating pancreatic diseases (e.g., acute or chronic pancreatitis, pancreatic cancer, etc.). The metastin derivative of the present invention, its salts, or prodrugs thereof have an effect of regulating a function of the regulating a function of the placenta and are useful as drugs for preventing/treating choriocarcinoma, hydatid mole, invasive mole, miscarriage, fetal hypoplasia, abnormal glucose metabolism, abnormal lipid metabolism or labor induction.

[1021] The metastin receptor agonist including the metastin derivative of the present invention, its salts, or prodrugs thereof have effects of increasing blood glucose, promoting pancreatic glucagon secretion or promoting urine formation and are useful as drugs for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity.

[1022] In addition, the metastin derivative of the present invention, its salts, or prodrugs thereof have excellent effects of promoting gonadotropic hormone secretion, promoting sex hormone secretion or inducing or promoting ovulation, etc. and are useful as low-toxic and safe drugs, e.g., gonadal function-improving agents, agents for preventing/treating hormone-dependent cancer (e.g., prostate cancer, breast cancer), infertility, endometriosis or myoma of the uterus, ovulation inducers or stimulators, gonadotropic hormone secretagogue agents, sex hormone secretagogue agents, etc.

[1023] Moreover, the metastin derivative of the present invention, its salts, or prodrugs thereof are useful as agents for preventing/treating Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, etc.

SEQUENCE LISTING

<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 22

<210> SEQ ID NO 1

<211> LENGTH: 54

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 1

Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln
1 5 10 15

Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly
20 25 30

Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn
35 40 45

Ser Phe Gly Leu Arg Phe
50

<210> SEQ ID NO 2

<211> LENGTH: 162

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 2

ggtaacttctc tgtctccgcc gccggaatct tctggttctc gtcagcagcc gggctctgtct 60

gtcccgcaact ctgcgcagat cccggctccg cagggtgctg ttctggttca gcgtgaaaaa 120

gacctgccga actacaactg gaactctttc ggtctgcgtt tc 162

-continued

<210> SEQ ID NO 3
<211> LENGTH: 152
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Mus musculus

<400> SEQUENCE: 3

Met Tyr Leu Arg Phe Gly Val Asp Val Cys Ser Leu Ser Pro Trp Lys
 5 10 15
Glu Thr Val Asp Leu Pro Leu Pro Pro Arg Met Ile Ser Met Ala Ser
 20 25 30
Trp Gln Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Thr Tyr Gly Glu Pro Leu
 35 40 45
Ala Lys Val Ala Pro Gly Ser Thr Gly Gln Gln Ser Gly Pro Gln Glu
 50 55 60
Leu Val Asn Ala Trp Glu Lys Glu Ser Arg Tyr Ala Glu Ser Lys Pro
 65 70 75 80
Gly Ser Ala Gly Leu Arg Ala Arg Arg Ser Ser Pro Cys Pro Pro Val
 85 90 95
Glu Gly Pro Ala Gly Arg Gln Arg Pro Leu Cys Ala Ser Arg Ser Arg
 100 105 110
Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp
 115 120 125
Leu Ser Thr Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Tyr Gly Arg Arg
 130 135 140
Gln Ala Ala Arg Ala Ala Arg Gly
 145 150

<210> SEQ ID NO 4
<211> LENGTH: 456
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Mus musculus

<400> SEQUENCE: 4

atgtatctga gatttggcgt tgatgtctgc agcctgagtc cctggaagga gactgtagac 60
ctgccccctc ctcccagaat gatctcaatg gcttcttggc agctgctgct tctcctctgt 120
gtcgccacct atggggagcc gctggcaaaa gtgaagcctg gatccacagg ccagcagtc 180
ggaccccagg aactcggtta tgcttgggaa aaggaatcgc ggtatgcaga gagcaagcct 240
gggtctgcag ggctgcgcgc tcgtaggctg tcgccatgcc cgccgggtga gggccccgcg 300
gggcgccagc ggcccctgtg tgccctccgc agtcgcctga tccctgcgcc ccgcggagcg 360
gtgctggtgc agcgggagaa ggacctgtcc acctacaact ggaactcctt cggcctgcgc 420
tacggcagga ggcaggcggc gcgggcagca cggggc 456

<210> SEQ ID NO 5
<211> LENGTH: 156
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Mus musculus

<400> SEQUENCE: 5

Met Tyr Leu Arg Phe Gly Val Asp Val Cys Ser Leu Ser Pro Trp Lys
 5 10 15
Glu Thr Val Asp Leu Pro Leu Pro Pro Arg Met Ile Ser Met Ala Ser
 20 25 30

-continued

Trp Gln Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Thr Tyr Gly Glu Pro Leu
 35 40 45
 Ala Lys Val Ala Pro Leu Val Lys Pro Gly Ser Thr Gly Gln Gln Ser
 50 55 60
 Gly Pro Gln Glu Leu Val Asn Ala Trp Glu Lys Glu Ser Arg Tyr Ala
 65 70 75 80
 Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ala Gly Leu Arg Ala Arg Arg Ser Ser Pro
 85 90 95
 Cys Pro Pro Val Glu Gly Pro Ala Gly Arg Gln Arg Pro Leu Cys Ala
 100 105 110
 Ser Arg Ser Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Ala Val Leu Val Gln
 115 120 125
 Arg Glu Lys Asp Leu Ser Thr Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg
 130 135 140
 Tyr Gly Arg Arg Gln Ala Ala Arg Ala Ala Arg Gly
 145 150 155

<210> SEQ ID NO 6
 <211> LENGTH: 468
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Mus musculus

<400> SEQUENCE: 6

atgtatctga gatttggcgt tgaatgtctgc agcctgagtc cctggaagga gactgtagac 60
 ctgccccctc ctcccagaat gatctcaatg gcttcttggc agctgctgct tctcctctgt 120
 gtcgccacct atggggagcc gctggcaaaa gtggcacctt tgggaagcc tggatccaca 180
 ggccagcagt ccggacccca ggaactcgtt aatgcctggg aaaaggaatc gcggtatgca 240
 gagagcaagc ctgggtctgc agggctgcgc gctcgtaggt cgctgccatg cccgccggtt 300
 gagggccccc cgggggccca gcggccctg tgtgcctccc gcagtcgcct gatccctgcg 360
 ccccgcgag cggtgctggt gcagcgggag aaggacctgt ccacctacaa ctggaactcc 420
 ttcggcctgc gctacggcag gaggcaggcg gcgcgggcag cacggggc 468

<210> SEQ ID NO 7
 <211> LENGTH: 130
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Rattus sp.

<400> SEQUENCE: 7

Met Thr Ser Leu Ala Ser Trp Gln Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala
 5 10 15
 Ser Phe Gly Glu Pro Leu Ala Lys Met Ala Pro Val Val Asn Pro Glu
 20 25 30
 Pro Thr Gly Gln Gln Ser Gly Pro Gln Glu Leu Val Asn Ala Trp Gln
 35 40 45
 Lys Gly Pro Arg Tyr Ala Glu Ser Lys Pro Gly Ala Ala Gly Leu Arg
 50 55 60
 Ala Arg Arg Thr Ser Pro Cys Pro Pro Val Glu Asn Pro Thr Gly His
 65 70 75 80
 Gln Arg Pro Pro Cys Ala Thr Arg Ser Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg
 85 90 95
 Gly Ser Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Met Ser Ala Tyr Asn Trp

-continued

100	105	110
Asn Ser Phe Gly Leu Arg Tyr Gly Arg Arg Gln Val Ala Arg Ala Ala		
115	120	125
Arg Gly		
130		

<210> SEQ ID NO 8
 <211> LENGTH: 390
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Rattus sp.

<400> SEQUENCE: 8

atgacctcgc tggcttcttg gcagctgctg cttctcctct gtgtggcctc ttttggggag	60
ccactggcaa aaatggcacc tgtgtgaac cctgaacca caggccaaca gtcgggaccc	120
caggaaactcg ttaatgcctg gcaaaaggcg ccgcggtatg cagagagcaa gcctggggct	180
gcaggactgc gcgctgcgag aacatcgcca tgcccgccgg tggagaaccc cacggggcac	240
cagcgggccc cgtgtgccac ccgcagtcgc ctgatccctg cgccccgcgg atcgggtgctg	300
gtgcagcgcg agaaggacat gtcagcctac aactggaact cctttggcct gcgctacggc	360
aggaggcagg tggcgcgggc ggcacggggc	390

<210> SEQ ID NO 9
 <211> LENGTH: 398
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 9

Met His Thr Val Ala Thr Ser Gly Pro Asn Ala Ser Trp Gly Ala Pro	
5 10 15	
Ala Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Ala Asn Ala Ser Asp Gly	
20 25 30	
Pro Val Pro Ser Pro Arg Ala Val Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe	
35 40 45	
Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile	
50 55 60	
Tyr Val Ile Cys Arg His Lys Pro Met Arg Thr Val Thr Asn Phe Tyr	
65 70 75 80	
Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val	
85 90 95	
Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Gly Trp Val Leu Gly Asp	
100 105 110	
Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala	
115 120 125	
Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr	
130 135 140	
Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu	
145 150 155 160	
Ala Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro	
165 170 175	
Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro Arg Ala Tyr Cys Ser	
180 185 190	
Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn	
195 200 205	

-continued

Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr
 210 215 220
 Ala Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Val Ala Val Arg Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Ala Asp Ser Ala Leu Gln Gly Gln Val Leu Ala Glu Arg Ala Gly Ala
 245 250 255
 Val Arg Ala Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe
 260 265 270
 Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu
 275 280 285
 Gly Pro Ala Gly Ser Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu
 290 295 300
 Lys Thr Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro
 305 310 315 320
 Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Arg Arg
 325 330 335
 Val Cys Pro Cys Ala Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Pro Gly
 340 345 350
 Pro Ser Asp Pro Ala Ala Pro His Ala Glu Leu His Arg Leu Gly Ser
 355 360 365
 His Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Lys Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ala
 370 375 380
 Ala Arg Gly Leu Cys Val Leu Gly Glu Asp Asn Ala Pro Leu
 385 390 395

<210> SEQ ID NO 10

<211> LENGTH: 1194

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 10

atgcacacgg tggctacgtc cggacccaac gcgtcctggg gggcaccggc caacgcctcc 60
 ggctgcccgg gctgtggcgc caacgcctcg gacggcccag tcccttcgcc gcgggcccgtg 120
 gacgcctggc tcgtgcccgt cttcttcgcc gcgtgatgc tgctgggcct ggtggggaac 180
 tcgctggtea tctacgtcat ctgccgccac aagccgatgc ggaccgtgac caactttcac 240
 atgcaccaac tgggggccac ggacgtgacc ttcctcctgt gctgcgtccc cttcacggcc 300
 ctgctgtacc cgctgcccgg ctgggtgctg ggcgacttca tgtgcaagtt cgtcaactac 360
 atccagcagg tctcggtgca ggccacgtgt gccactctga ccgccatgag tgtggaccgc 420
 tggtagctga cgggtgtccc gttgcgcgcc ctgcaccgcc gcaagccccg cctggcgctg 480
 gctgtcagcc tcagcatctg ggtaggctct gcggcggtgt ctgcgcgggt gctcgcctg 540
 caccgcctgt caccggggcc gcgcgcctac tgcagtgagg ccttccccag ccgcgcctg 600
 gagcgcgcct tcgcaactga caacctgctg gcgctgtacc tgtgcccgt gctcgcacc 660
 tgcgcctgct atgcggccat gctgcgccac ctgggcccgg tcgcctgctg ccccgcgccc 720
 gccgatagcg cctgcagggg gcagggtgctg gcagagcgcg caggcgccgt gcgggccaaag 780
 gtctcgcggc tgggtggcggc cgtgggtcctg ctcttcgccg cctgctgggg ccccatccag 840
 ctgttcctgg tgctgcaggc gctgggcccc gcgggctcct ggcaccacag cagctacgcc 900
 gcctacgcgc ttaagacctg ggctcactgc atgtcctaca gcaactccgc gctgaacccg 960

-continued

```

ctgtctctacg ccttctctggg ctgcacttc cgacaggcct tccgcgcgt ctgcccctgc 1020
gcgcgcgcgc gcccccgcg ccccccgcg cccggaccct cggacccgc agcccccac 1080
gcggagctgc accgcctggg gtcccaccg gcccccgcga gggcgagaa gccagggagc 1140
agtgggctgg ccgcgcgcg gctgtgcgtc ctgggggagg acaacgccc tctc 1194

```

```

<210> SEQ ID NO 11
<211> LENGTH: 396
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Rattus sp.

```

```

<400> SEQUENCE: 11

```

```

Met Ala Ala Glu Ala Thr Leu Gly Pro Asn Val Ser Trp Trp Ala Pro
      5              10              15

Ser Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Val Asn Ala Ser Asp Gly
      20              25              30

Pro Gly Ser Ala Pro Arg Pro Leu Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe
      35              40              45

Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile
      50              55              60

Phe Val Ile Cys Arg His Lys His Met Gln Thr Val Thr Asn Phe Tyr
      65              70              75              80

Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val
      85              90              95

Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Asp
      100             105             110

Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala
      115             120             125

Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr
      130             135             140

Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu
      145             150             155             160

Thr Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro
      165             170             175

Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro His Thr Tyr Cys Ser
      180             185             190

Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn
      195             200             205

Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr
      210             215             220

Gly Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Ala Ala Val Arg Pro Ala Pro
      225             230             235             240

Thr Asp Gly Ala Leu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Gln Arg Ala Gly Ala
      245             250             255

Val Arg Thr Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe
      260             265             270

Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu
      275             280             285

Gly Pro Ser Gly Ala Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu
      290             295             300

Lys Ile Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro
      305             310             315             320

```


-continued

Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Cys Arg
 325 330 335

Val Cys Pro Cys Gly Pro Gln Arg Gln Arg Arg Pro His Ala Ser Ala
 340 345 350

His Ser Asp Arg Ala Ala Pro His Ser Val Pro His Ser Arg Ala Ala
 355 360 365

His Pro Val Arg Val Arg Thr Pro Glu Pro Gly Asn Pro Val Val Arg
 370 375 380

Ser Pro Ser Val Gln Asp Glu His Thr Ala Pro Leu
 385 390 395

<210> SEQ ID NO 12

<211> LENGTH: 1188

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Rattus sp.

<400> SEQUENCE: 12

```

atggccgcag aggcgacgtt gggccgaac gtgagctggt gggctccgtc caacgcttcg    60
ggatgcccg gctgcggtgt caatgcctcg gatggcccag gctccgcgcc aaggccctcg    120
gatgcctggc tgggtccctt gtttttcgct gccctaattg tgcggggct agtcgggaac    180
tcaactgtca tcttcgttat ctgcgcccac aagcacatgc agaccgtcac caatttctac    240
atcgctaacc tggcgccac agatgtcact ttccttctgt gctgcgtacc ctccaccgcg    300
ctcctctatc cgctgcccac ctgggtgctg ggagacttca tgtgcaaatt cgtcaactac    360
atccagcagg tctcgggtgca agccacatgt gccactttga cagccatgag tgtggaccgc    420
tggtagctga ctgtgttccc gctgcgtgca ctccaccgcc gcaactccgc cctggccctg    480
actgtcagcc ttagcatctg ggtgggttcc gcagctgttt ccgcccgggt gctggctctg    540
caccgcctgt cgcccgggcc tcacacctac tgacgtgagg cgttcccgag ccgtgccctg    600
gagcgcgctt tcgcgtctca caacctgctg gccctatacc tgcgtccgct gctcgccacc    660
tcgcctgct acgggtgcat gctgcgccac ctgggcccgc ccgctgtacg ccccgacccc    720
actgatggcg cctgcaggg gcagctgcta gcacagcgcg ctggagcagt gcgcaccaag    780
gtctcccggc tgggtggcgc tgcgtcctg ctcttcgccc cctgctgggg ccgatccag    840
ctgttctcgg tgcctcaagg cctgggcccc tcgggggcct ggcaccctcg aagctatgcc    900
gcctacgcgc tcaagatctg ggctcactgc atgtcctaca gcaattctgc gctcaaccgc    960
ctgctctatg ccttcctggg ttcccacttc agacaggcct tctgcgcgt gtgcccctgc   1020
ggcccgcaac gccagcgctg gcccacgcg tcagcgccact cggaccgagc cgcaccccat   1080
agtgtgcgcg acagccgggc tgcgcacct gtccgggtca ggacccccga gcctgggaac   1140
cctgtgtgct gctcgccctc tgttcaggat gaacacactg ccccactc    1188

```

<210> SEQ ID NO 13

<211> LENGTH: 396

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Mus musculus

<400> SEQUENCE: 13

Met Ala Thr Glu Ala Thr Leu Ala Pro Asn Val Thr Trp Trp Ala Pro
 1 5 10 15

Ser Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Val Asn Ala Ser Asp Asp

-continued

20					25					30					
Pro	Gly	Ser	Ala	Pro	Arg	Pro	Leu	Asp	Ala	Trp	Leu	Val	Pro	Leu	Phe
	35						40					45			
Phe	Ala	Thr	Leu	Met	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Gly	Asn	Ser	Leu	Val	Ile
	50					55					60				
Tyr	Val	Ile	Cys	Arg	His	Lys	His	Met	Gln	Thr	Val	Thr	Asn	Phe	Tyr
	65					70					75				80
Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Thr	Asp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Cys	Cys	Val
			85						90					95	
Pro	Phe	Thr	Ala	Leu	Leu	Tyr	Pro	Leu	Pro	Ala	Trp	Val	Leu	Gly	Asp
			100					105					110		
Phe	Met	Cys	Lys	Phe	Val	Asn	Tyr	Ile	Gln	Gln	Val	Ser	Val	Gln	Ala
		115					120						125		
Thr	Cys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Met	Ser	Val	Asp	Arg	Trp	Tyr	Val	Thr
		130					135					140			
Val	Phe	Pro	Leu	Arg	Ala	Leu	His	Arg	Arg	Thr	Pro	Arg	Leu	Ala	Leu
				150							155				160
Ala	Val	Ser	Leu	Ser	Ile	Trp	Val	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Ala	Pro
			165						170						175
Val	Leu	Ala	Leu	His	Arg	Leu	Ser	Pro	Gly	Pro	Arg	Thr	Tyr	Cys	Ser
			180					185					190		
Glu	Ala	Phe	Pro	Ser	Arg	Ala	Leu	Glu	Arg	Ala	Phe	Ala	Leu	Tyr	Asn
		195					200						205		
Leu	Leu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Ala	Thr	Cys	Ala	Cys	Tyr
		210					215					220			
Gly	Ala	Met	Leu	Arg	His	Leu	Gly	Arg	Ala	Ala	Val	Arg	Pro	Ala	Pro
	225					230					235				240
Thr	Asp	Gly	Ala	Leu	Gln	Gly	Gln	Leu	Leu	Ala	Gln	Arg	Ala	Gly	Ala
			245						250					255	
Val	Arg	Thr	Lys	Val	Ser	Arg	Leu	Val	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Leu	Phe
			260					265					270		
Ala	Ala	Cys	Trp	Gly	Pro	Ile	Gln	Leu	Phe	Leu	Val	Leu	Gln	Ala	Leu
			275					280					285		
Gly	Pro	Ser	Gly	Ala	Trp	His	Pro	Arg	Ser	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Ala	Val
			290				295						300		
Lys	Ile	Trp	Ala	His	Cys	Met	Ser	Tyr	Ser	Asn	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro
			305				310					315			320
Leu	Leu	Tyr	Ala	Phe	Leu	Gly	Ser	His	Phe	Arg	Gln	Ala	Phe	Cys	Arg
			325					330						335	
Val	Cys	Pro	Cys	Arg	Gln	Arg	Gln	Arg	Arg	Pro	His	Thr	Ser	Ala	
			340					345					350		
His	Ser	Asp	Arg	Ala	Ala	Thr	His	Thr	Val	Pro	His	Ser	Arg	Ala	Ala
			355					360					365		
His	Pro	Val	Arg	Ile	Arg	Ser	Pro	Glu	Pro	Gly	Asn	Pro	Val	Val	Arg
			370				375					380			
Ser	Pro	Cys	Ala	Gln	Ser	Glu	Arg	Thr	Ala	Ser	Leu				
			385				390					395			

<210> SEQ ID NO 14

<211> LENGTH: 1188

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Mus musculus

-continued

<400> SEQUENCE: 14

```

atggccaccg aggcgacatt ggctcccaat gtgacctggt gggctccgtc caacgcttca    60
ggatgcccaag gctgcggtgt caacgcctcg gatgaccag gctctgcgcc aaggccccctg    120
gatgcctggc tggttcccct gtttttcgct acactcatgt tgctgggct ggtcggaaac    180
tcattggtca tctacgttat ctgccgccac aagcacatgc agacagttac caacttctac    240
atcgctaacc tggctgccac agacgtcact ttcctactgt gctgcgtgcc ctccaccgca    300
ctcctctacc cgctgccgcg ctgggtgctg ggagacttca tgtgcaaatt cgtcaactac    360
atccagcagg tctcggtgca agccacatgt gccactctga cggccatgag tgtggaccgc    420
tggatatgta ctgtgttccc gctgcgtgca ctccaccgcc gcaactccgcg cctggccctg    480
gctgtcagcc tcagcatctg ggtgggggta gcagctgtgt ccgccccggt gctggccctg    540
caccgcctgt cgccaggggc tcgcacctac tgcagcgagg cgtttccag ccgcgccctg    600
gagcgcgctt tcgcgctcta caacctgctg gctctataac tgctgccgct gctcgccacc    660
tgccgctgct acggcgccat gctgcgccac ctgggcccgt cggctgtacg ccccgacccc    720
actgacggcg cctcgcaggg acagctgcta gcacagcgcg ccggagcagt gcgcaccaag    780
gtctcccggc tgggtggcgc tgcgtcctg ctcttcgccg cctgctgggg ccgatccag    840
ctgttctcgg tgcttcaagc cctggggccc tcgggggcct ggcaccctcg aagctatgcc    900
gcctacgcgg tcaagatctg ggctcactgc atgtcctaca gcaactcggc gctcaatccg    960
ctgctctatg ctttctcggg ttccaccttc agacaggcct tctgccgcgt gtgcccctgc   1020
tgccggcaac gccagcgccg gccccacacg tcagcgcaact cggaccgagc tgcaactcac   1080
actgtgccgc acagccgtgc tgcgcacct gtgcggatca ggagcccgga gcctgggaac   1140
cctgtgtgtc gctgcgccg cgctcagagt gaacgcactg cctcactc                   1188

```

<210> SEQ ID NO 15

<211> LENGTH: 15

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Artificial

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: the C-terminus of the polypeptide is amide
(-CONH₂) form

<400> SEQUENCE: 15

```

Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe
1           5           10          15

```

<210> SEQ ID NO 16

<211> LENGTH: 10

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Artificial

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: the C-terminus of the polypeptide is amide
(-CONH₂) form

<400> SEQUENCE: 16

```

Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe
1           5           10

```

<210> SEQ ID NO 17

<211> LENGTH: 9

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Artificial

-continued

<220> FEATURE:
 <223> OTHER INFORMATION: the C-terminus of the polypeptide is amide
 (-CONH₂) form

<400> SEQUENCE: 17

Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe
 1 5 9

<210> SEQ ID NO 18
 <211> LENGTH: 8
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Artificial
 <220> FEATURE:
 <223> OTHER INFORMATION: the C-terminus of the polypeptide is amide
 (-CONH₂) form

<400> SEQUENCE: 18

Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe
 1 5 8

<210> SEQ ID NO 19
 <211> LENGTH: 45
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 19

aaggacctgc cgaactacaa ctggaactcc ttggcctgc gcttc 45

<210> SEQ ID NO 20
 <211> LENGTH: 30
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 20

tacaactgga actccttcgg cctgcgcttc 30

<210> SEQ ID NO 21
 <211> LENGTH: 27
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 21

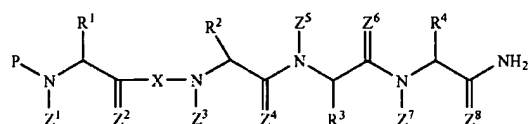
aactggaact ccttcggcct gcgcttc 27

<210> SEQ ID NO 22
 <211> LENGTH: 24
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 22

tggaactcct tcggcctgcg cttc 24

1. Metastin derivative represented by formula (I):



[wherein,

each of Z¹, Z³, Z⁵ and Z⁷ represents hydrogen atom or a C₁₋₃ alkyl group; each of Z², Z⁴, Z⁶ and Z⁸ represents hydrogen atom, O or S;

R¹ represents (1) hydrogen atom, or (2) a C₁₋₈ alkyl group optionally substituted with a substituent selected from the group consisting of an optionally substituted carbamoyl group, an optionally substituted hydroxyl

group and an optionally substituted aromatic cyclic group;

R² represents (1) hydrogen atom or (2) a cyclic or linear C₁₋₁₀ alkyl group, or (3) a C₁₋₁₀ alkyl group consisting of a cyclic alkyl group and a linear alkyl group;

R³ represents:

(1) a C₁₋₈ alkyl group having an optionally substituted basic group and optionally having an additional substituent,

(2) an aralkyl group having an optionally substituted basic group and optionally having an additional substituent,

(3) a C₁₋₄ alkyl group having a non-aromatic cyclic hydrocarbon group of carbon atoms not greater than 7 having an optionally substituted basic group, and optionally having an additional substituent, or,

(4) a C₁₋₄ alkyl group having a non-aromatic heterocyclic group of carbon atoms not greater than 7 having an optionally substituted basic group, and optionally having an additional substituent;

R⁴ represents a C₁₋₄ alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent selected from the group consisting of:

(1) an optionally substituted C₆₋₁₂ aromatic hydrocarbon group,

(2) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

(3) an optionally substituted C₈₋₁₄ aromatic fused-ring group,

(4) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

(5) an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7, and,

(6) an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7;

X represents a group shown by formula: —NHCH(Q¹)YQ²C(=Z⁹)— (wherein, Q¹ represents a C₁₋₄ alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent selected from the group consisting of:

(1) an optionally substituted C₆₋₁₂ aromatic hydrocarbon group,

(2) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

(3) an optionally substituted C₈₋₁₄ aromatic fused-ring group,

(4) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11 carbon

atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

(5) an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7, and,

(6) an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7;

Q² represents (1) CH₂, which may optionally be substituted with a C₁₋₄ alkyl group optionally substituted with a substituent selected from the group consisting of carbamoyl group and hydroxyl group, (2) NH, which may optionally be substituted with a C₁₋₄ alkyl group optionally substituted with a substituent selected from the group consisting of carbamoyl group and hydroxyl group, or (3) 0;

Y represents a group shown by formula: —CONH—, —CSNH—, —CH₂NH—, —NHCO—, —CH₂O—, —CH₂S— or —CH₂CH₂—, which may optionally be substituted with a C₁₋₆ alkyl group; and,

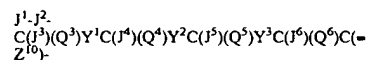
Z⁹ represents hydrogen atom, O or S; and,

P represents:

(1) hydrogen atom;

(2) an optional amino acid residue continuously or discontinuously bound from the C-terminal end of the 1-48 amino acid sequence in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1;

(3) a group represented by formula:



(wherein,

J¹ represents (a) hydrogen atom or (b) (i) a C₁₋₁₅ acyl group, (ii) a C₁₋₁₅ alkyl group, (iii) a C₆₋₁₄ aryl group, (iv) a carbamoyl group, (v) a carboxyl group, (vi) a sulfinio group, (vii) an amidino group or (viii) a glyoxyloxy group, which group may optionally be substituted with (a) hydrogen atom, or (b) a substituent containing an optionally substituted cyclic group;

J² represents (1) NH optionally substituted with a C₁₋₆ alkyl group, (2) CH₂ optionally substituted with a C₁₋₆ alkyl group, (3) O or (4) S;

each of J³ through J⁶ represents hydrogen atom or a C₁₋₃ alkyl group;

each of Q³ through Q⁶ represents a C₁₋₄ alkyl group, which may optionally be substituted with a substituent selected from the group consisting of:

(1) an optionally substituted C₆₋₁₂ aromatic hydrocarbon group,

(2) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic heterocyclic group consisting of 1 to 7 carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

(3) an optionally substituted C₈₋₁₄ aromatic fused-ring group,

(4) an optionally substituted 5- to 14-membered aromatic fused heterocyclic group consisting of 3 to 11

carbon atoms and hetero atoms selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur atoms,

- (5) an optionally substituted non-aromatic cyclic hydrocarbon group having carbon atoms not greater than 7,
- (6) an optionally substituted non-aromatic heterocyclic group having carbon atoms not greater than 7,
- (7) an optionally substituted amino group,
- (8) an optionally substituted guanidino group,
- (9) an optionally substituted hydroxyl group,
- (10) an optionally substituted carboxyl group,
- (11) an optionally substituted carbamoyl group, and
- (12) an optionally substituted sulfhydryl group, or hydrogen atom;

J^3 and Q^3 , J^4 and Q^4 , J^5 and Q^5 or J^6 and Q^6 may be combined together, or, J^2 and Q^3 , Y^1 and Q^4 , Y^2 and Q^5 , or Y^3 and Q^6 may be combined together, to form a ring;

each of Y^1 through Y^3 represents a group represented by formula:

$-\text{CON}(J^{13})-$, $-\text{CSN}(J^{13})-$, $-\text{C}(J^{14})\text{N}(J^{13})-$ or $-\text{N}(J^{13})\text{CO}-$ (wherein each of J^{13} and J^{14} represents hydrogen atom or a C_{1-3} alkyl group); and,

Z^{10} represents hydrogen atom, O or S);

- (4) a group represented by formula: $J^1-J^2-C(J^7)(Q^7)Y^2C(J^8)(Q^8)Y^3C(J^9)(Q^9)C(=Z^{10})$ (wherein, J^1 and J^2 have the same significance as described above; J^7 through J^9 have the same significance as J^3 ; Q^7 through Q^9 have the same significance as Q^3 ; Y^2 and Y^3 have the same significance as described above; Z^{10} has the same significance as described above; J^7 and Q^7 , J^8 and Q^8 or J^9 and Q^9 may be combined together, or, J^2 and Q^7 , Y^2 and Q^8 or Y^3 and Q^9 may be combined together, to form a ring);

- (5) a group represented by formula:

$J^1-J^2-C(J^{10})(Q^{10})Y^3C(J^{11})(Q^{11})C(=Z^{10})$.

(wherein,

J^1 and J^2 have the same significance as described above represents;

J^{10} and J^{11} have the same significance as J^3 ;

Q^{10} and Q^{11} have the same significance as Q^3 ;

Y^3 has the same significance as described above;

Z^{10} has the same significance as described above; and,

J^{10} and Q^{10} or J^{11} and Q^{11} may be combined together, or J^2 and Q^{10} or Y^3 and Q^{11} may be combined together, to form a ring);

- (6) a group represented by formula: $J^1-J^2-C(J^{12})(Q^{12})C(=Z^{10})$;

(wherein,

J^1 and J^2 have the same significance as described above;

J^{12} has the same significance as J^3 ;

Q^{12} has the same significance as Q^3 ;

Z^{10} has the same significance as described above; and,

J^{12} and Q^{12} may be combined together, or J^2 and Q^{12} may be combined together, to form a ring); or,

- (7) a group represented by formula: J^1- (wherein, J^1 has the same significance as described above)] (provided that a peptide consisting of the amino acid sequence of 1-54, 2-54, 3-54, 4-54, 5-54, 6-54, 7-54, 8-54, 9-54, 10-54, 11-54, 12-54, 13-54, 14-54, 15-54, 16-54, 17-54, 18-54, 19-54, 20-54, 21-54, 22-54, 23-54, 24-54, 25-54, 26-54, 27-54, 28-54, 29-54, 30-54, 31-54, 32-54, 33-54, 34-54, 35-54, 36-54, 37-54, 38-54, 39-54, 40-54, 41-54, 42-54, 43-54, 44-54, 45-54, 46-54, 47-54, 48-54 or 49-54 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 is excluded), or a salt thereof.

2. The metastin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, which is:

- (i) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 141),
- (ii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂ (Compound No. 174),
- (iii) 3-(3-Indolyl)propionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 260),
- (iv) 3-Phenylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 269),
- (v) 2-(indol-3-yl)ethylcarbamoyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 279),
- (vi) D-Tyr-Asn-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 286),
- (vii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheT(CSNH)Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 296),
- (viii) TyrΨ(CH₂NH)Asn-D-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 300),
- (ix) D-Tyr-D-Asn-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 303),
- (x) D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 305),
- (xi) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe(4F)-NH₂ (Compound No. 318),
- (xii) D-Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-PheT(NHCO)Gly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 319),
- (xiii) 3-Pyridylpropionyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 322),
- (xiv) 4-Imidazoleacetyl-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Phe-NH₂ (Compound No. 323),
- (xv) D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂ (Compound No. 385), or

(xvi) D-Tyr-D-Pya(4)-Asn-Ser-Phe-AzaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH₂ (Compound No. 386).

3. A prodrug of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof.

4. A pharmaceutical comprising the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

5. The pharmaceutical according to claim 4, which is an agent for suppressing cancer metastasis or an agent for suppressing cancer proliferation.

6. The pharmaceutical according to claim 4, which is an agent for preventing/treating cancer.

7. The pharmaceutical according to claim 4, which is an agent for regulating a function of the pancreas.

8. The pharmaceutical according to claim 4, which is an agent for preventing/treating acute or chronic pancreatitis or pancreatic cancer.

9. The pharmaceutical according to claim 4, which is an agent for regulating a function of the placenta.

10. The pharmaceutical according to claim 4, which is an agent for preventing/treating choriocarcinoma, hydatid mole, invasive mole, miscarriage, fetal hypoplasia, abnormal glucose metabolism, abnormal lipid metabolism or labor induction.

11. The pharmaceutical according to claim 4, which is an agent for improving gonadal function.

12. The pharmaceutical according to claim 4, which is an agent for preventing/treating hormone-dependent cancer, infertility, endometriosis or myoma of the uterus.

13. The pharmaceutical according to claim 4, which is an agent for inducing or stimulating ovulation.

14. The pharmaceutical according to claim 4, which is a gonadotropic hormone secretagogue agent or a sex hormone secretagogue agent.

15. The pharmaceutical according to claim 4, which is an agent for preventing/treating Alzheimer's disease or moderate cognitive impairment.

16. A method for suppressing cancer metastasis or cancer proliferation, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

17. A method for preventing/treating cancer, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

18. A method for regulating a function of the pancreas, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

19. A method for preventing/treating acute or chronic pancreatitis or pancreatic cancer, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

20. A method for regulating a function of the placenta, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

21. A method for preventing/treating choriocarcinoma, hydatid mole, invasive mole, miscarriage, fetal hypoplasia, abnormal glucose metabolism, abnormal lipid metabolism or labor induction, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

22. A method for improving gonadal function, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

23. A method for preventing/treating hormone-dependent cancer, infertility, endometriosis or myoma of the uterus, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

24. A method for inducing or stimulating ovulation, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

25. A method for promoting gonadotropic hormone secretion or promoting sex hormone secretion, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

26. A method for preventing/treating Alzheimer's disease or moderate cognitive impairment, which comprises administering to a mammal an effective dose of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

27. Use of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for suppressing cancer metastasis or an agent for suppressing cancer proliferation.

28. Use of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for preventing/treating cancer.

29. Use of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for regulating a function of the pancreas.

30. Use of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for preventing/treating acute or chronic pancreatitis or pancreatic cancer.

31. Use of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for regulating a function of the placenta.

32. Use of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for preventing/treating choriocarcinoma, hydatid mole, invasive mole, miscarriage, fetal hypoplasia, abnormal glucose metabolism, abnormal lipid metabolism or labor induction.

33. Use of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for improving gonadal function.

34. Use of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for preventing/treating hormone-dependent cancer, infertility, endometriosis or myoma of the uterus.

35. Use of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for inducing or stimulating ovulation.

36. Use of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture a gonadotropic hormone secretagogue agent or a sex hormone secretagogue agent.

37. Use of the metastatin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof to manufacture an agent for preventing/treating Alzheimer's disease or moderate cognitive impairment.

38. A pancreatic glucagon secretagogue agent, comprising an agonist for a metastin receptor.

39. An agent for promoting urine formation, comprising an agonist for a metastin receptor.

40. An agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity, comprising an agonist for a metastin receptor.

41. The agent according to any one of claims 38 through 40, wherein the agonist for a metastin receptor is the metastin derivative (I) according to claim 1 or a salt thereof, or a prodrug thereof.

42. A method for promoting pancreatic glucagon secretion, which comprises administering to a mammal an effective dose of the agonist for a metastin receptor.

43. A method for promoting urine formation, which comprises administering to a mammal an effective dose of the agonist for a metastin receptor.

44. A method for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity, which comprises administering to a mammal an effective dose of the agonist for a metastin receptor.

45. Use of the agonist for a metastin receptor to manufacture a pancreatic glucagon secretagogue agent.

46. Use of the agonist for a metastin receptor to manufacture an agent for promoting urine formation.

47. Use of the agonist for a metastin receptor to manufacture an agent for preventing/treating obesity, hyperlipemia, type II diabetes mellitus, hypoglycemia, hypertension, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, edema, urinary disturbances, insulin resistance, unstable diabetes, fatty atrophy, insulin allergy, insulinoma, arteriosclerosis, thrombotic disorders or lipotoxicity.

* * * * *